

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関  
国際事務局(43)国際公開日  
2004年1月8日 (08.01.2004)

PCT

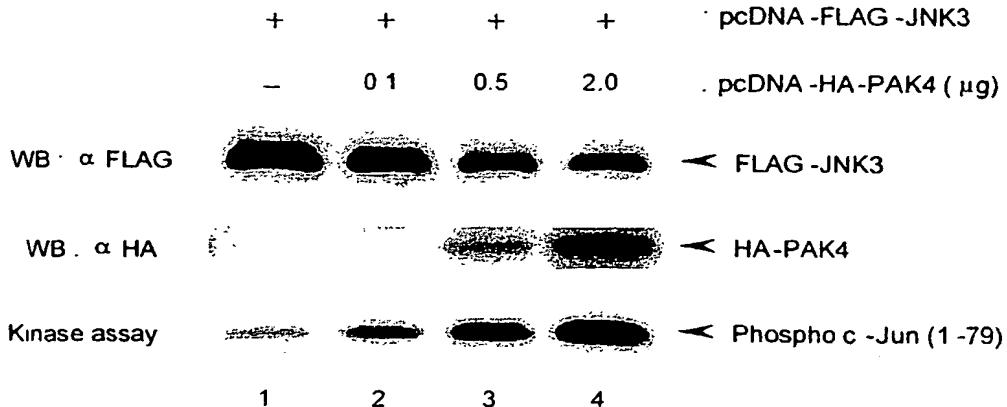
(10)国際公開番号  
WO 2004/002532 A1

(51) 国際特許分類 <sup>7</sup> :	A61K 45/00, A61P 25/00, 25/14, 25/16, 25/28		千葉市美浜区 中瀬1丁目3番地 幕張テクノガーデンD棟17階 Chiba (JP). 第一製薬株式会社 (DAIICHI PHARMACEUTICAL CO.,LTD.) [JP/JP]; 〒103-8234 東京都中央区 日本橋三丁目14番10号 Tokyo (JP).
(21) 国際出願番号:	PCT/JP2003/008179		(72) 発明者; および
(22) 国際出願日:	2003年6月27日 (27.06.2003)		(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 土居 洋文 (DOI,Hirofumi) [JP/JP]; 〒261-8501 千葉県千葉市美浜区中瀬1丁目3番地 幕張テクノガーデンD棟17階セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式会社内 Chiba (JP). 細木 信也 (HOSOGI,Shinya) [JP/JP]; 〒261-8501 千葉県千葉市美浜区中瀬1丁目3番地 幕張テクノガーデンD棟17階セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式会社内 Chiba (JP). 和田 直也 (WADA,Naoya) [JP/JP]; 〒134-8630 東京都江戸川区北葛西一丁目16番13号 第一製薬株式会社 東京研究開発センター内 Tokyo (JP).
(25) 国際出願の言語:	日本語		
(26) 国際公開の言語:	日本語		
(30) 優先権データ:	特願2002-190909 2002年6月28日 (28.06.2002) JP	特願2002-190910 2002年6月28日 (28.06.2002) JP	
(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について):	セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式会社(CELESTAR LEXICO-SCIENCES,INC.) [JP/JP]; 〒261-8501 千葉県		

(続葉有)

(54) Title: MKK7 ACTIVATION INHIBITOR

(54) 発明の名称: MKK7活性化阻害剤



(57) Abstract: Proteins PAK4 and JIK each binding to MKK7 and directly phosphorylating it are found out. Thus, it is intended to provide an inhibitor of c-Jun phosphorylation by JNK3 and a method of inhibiting phosphorylation characterized in that at least one of binding of PAK4 to MKK7, phosphorylation of MKK7 by PAK4, binding of JIK to MKK7 and phosphorylation of MKK7 by JIK is inhibited; a preventive and/or a remedy for diseases based on the c-Jun phosphorylation by JNK3; and a preventive method and/or a therapeutic method. It is also intended to provide a method of identifying a compound inhibiting binding of PAK4 to MKK7, phosphorylation of MKK7 by PAK4, binding of JIK to MKK7 and phosphorylation of MKK7 by JIK; and a compound obtained by the identification method. It is further intended to provide a medicinal composition containing at least one of the above compound and the above inhibitor in an effective dose.

WO 2004/002532 A1

(57) 要約: MKK7と結合してこれを直接リン酸化する蛋白質PAK4およびJIKを見出し、PAK4とMKK7の結合、PAK4によるMKK7のリン酸化、JIKとMKK7の結合およびJIKによるMKK7のリン酸化の少なくとも1つを阻害することを特徴とするJNK3によるc-Junリン酸化阻害剤およびリン酸化阻害方法、JNK3によるc-Junリン酸化に基づく疾患の防止剤およびまたは治療剤並びに防止方法およびまたは治疗方法を提供した。さらにPAK4とMKK7の結合、PAK4によるMKK7のリン酸化、JIKとMKK7の結合またはJIKによるMKK7のリン酸化を阻害する化合物の同定方法および該同定方法で得られた化合物を提供了。また、上記化合物および上記阻害剤のうち少なくとも1種を有効量含有してなる医薬組成物を提供了。



(74) 代理人: 庄司 隆 (SHOJI,Takashi); 〒101-0032 東京都  
千代田区岩本町 3 丁目 2 番 10 号 SN 岩本町ビル  
6 階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,  
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI,  
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,  
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,  
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,  
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,  
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),  
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 國際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

## 明細書

## MKK 7 活性化阻害剤

5 技術分野

本発明は、MAPキナーゼキナーゼ7 (MKK7) の活性化を阻害することを特徴とするc-Jun N末端キナーゼ3 (JNK3)によるc-Junリン酸化の阻害、JNK3によるc-Junリン酸化に基づく疾患の改善、並びに神経変性疾患の改善に関する。より詳しくは、MKK7とp21活性化キナーゼ4 (PAK4) の相互作用および/またはMKK7とJNK/SAPK-インヒビトリーキナーゼ (JIK) の相互作用を阻害すること、すなわち、PAK4がMKK7に結合して直接MKK7をリン酸化することにより引き起こされるMKK7の活性化および/またはJIKがMKK7に結合して直接MKK7をリン酸化することにより引き起こされるMKK7の活性化を阻害することを特徴とするJNK3によるc-Junリン酸化の阻害剤および阻害方法に関する。また、かかる特徴を有するJNK3によるc-Junリン酸化に基づく疾患の防止剤および/または阻害剤並びに防止方法および/または阻害方法、さらに神経変性の防止剤および/または阻害剤並びに防止方法および/または阻害方法に関する。さらに、PAK4とMKK7の結合、PAK4によるMKK7のリン酸化、JIKとMKK7の結合またはJIKによるMKK7のリン酸化を阻害する化合物の同定方法および該同定方法で得られた化合物に関する。

背景技術

c-Jun N末端キナーゼ (以下、JNKと略称する。) は、MAPキナーゼ (以下、MAPKと略称する。) ファミリーに属する蛋白質リン酸化酵素である。哺乳類では3つのJNK遺伝子 (JNK1、JNK2およびJNK3) が見出されている。これらのうちJNK3は脳神経系などに特異的に発現している。

JNK3は、古典的MAPKとは異なり、増殖刺激ではほとんど活性化しない。J

NK 3 の活性化は、細胞に対するストレス (DNA 損傷、紫外線、熱、高浸透圧、小胞体ストレス、活性酸素など。) や炎症性サイトカイン [腫瘍壞死因子 (TNF)、インターロイキン-1 (IL-1) など。] により引き起こされる。活性化された JNK は、細胞質から核内へ移行し、c-Jun などの転写因子のリン酸化を介して標的遺伝子の発現を制御すると考えられている。

JNK の活性化は、各種ストレス刺激により引き起こされるアポトーシスに関与している。例えば、神経成長因子 (NGF) 除去による神経細胞死において JNK が活性化すること (非特許文献 1)、NGF 除去による神経細胞死が c-Jun のドミナントネガティブ変異体 (dominant negative mutant) の発現 10 により抑制されることが報告されている (非特許文献 2)。さらに、JNK 3 のノックアウトマウスでは、カイニン酸投与による興奮性神経死が抑制されることが報告されている (非特許文献 3)。これらから、JNK 3 の活性化が神経細胞死に関与していることが示唆されている。

JNK を活性化させる MAPK キナーゼ (以下、MAPKK と略称する。) として、15 MKK 4 と MKK 7 が知られている。MKK 7 は、MAPKK 7、MAP2K7、JNKK 2 とも呼ばれ、JNK を特異的にリン酸化して活性化させる (非特許文献 4 および 5)。一方、MKK 4 は、JNK をリン酸化して活性化させるだけではなく、同じく MAPK ファミリーの一員である ERK 2 や p38 もリン酸化して活性化させる。MKK 4 遺伝子を破壊した胚性幹細胞 (ES 細胞) においても浸透圧刺激または紫外 20 線による JNK 活性化が認められることから (非特許文献 6)、MKK 7 は、MKK 4 と独立して JNK の活性化に働いていると考えられている。

JNK の活性化はまた、低分子量 GTP 蛋白質の 1 つである cdc42 からのシグナルによって引き起こされる (非特許文献 7)。cdc42 に結合してそのシグナルを伝達するキナーゼとして、p21 活性化キナーゼ (p21-activated kinase; PAK) が知られている。実際、PAK ファミリーの一員である PAK 1、PAK 2、PAK 3 または PAK 4 の過剰発現により、JNK のシグナル伝達経路が活性化することが報告されている (それぞれ非特許文献 8、9、7 および 10)。

しかし、PAKとJNK活性化との間の詳細なシグナル伝達経路の機構、例えば直接的なあるいは間接的なものについては明らかにされていない。

c d c 4 2が神経細胞死に関与していることを示唆する知見がいくつか報告されて

いる。例えば、神経細胞への活性化型c d c 4 2の強制発現は神経細胞死を誘導し、

5 また、c d c 4 2のドミナントネガティブ変異体はNGF除去による神経細胞死を抑制する（非特許文献11）。また、活性化型c d c 4 2により、JNKと同様、MKK7も活性化することが報告されている（非特許文献12）。よって、c d c 4 2からM KK7を介してJNKへと伝わるシグナル伝達経路が神経細胞死に関与している可能性が考えられる。

10 JNK3活性化の原因となる各種ストレスの1つとして、小胞体ストレス（以下、ERストレスと略称する。）が挙げられる。ERストレスは、各種刺激（グルコース枯渇、カルシウム濃度恒常性の変化、活性酸素など。）により、小胞体（以下、ERと略称することもある。）における蛋白質のフォールディング（folding）の過程に異常が起こり、ER内に異常蛋白質が蓄積することにより生じる。ERストレスが生じると、小胞体内分子シャペロンの発現が誘導され（unfolded protein response: UPR）、フォールディング異常（misfolding）の解消へと向かう。この過程においてERストレスのセンサー蛋白質として働いているものとして、IRE1が知られている（非特許文献13）。

ERストレスの負荷によるJNK活性化の過程に、IRE1およびTRAF2が関与していることが報告されている（非特許文献14および15）。すなわち、IRE1破壊細胞株ではERストレスの負荷によるJNK活性化が抑制され、また、IRE1の過剰発現によりJNKが活性化する。さらに、IRE1はTRAF2と結合し、また、TRAF2のドミナントネガティブ変異体はIRE1によるJNKの活性化を阻害する。

25 ERストレスの負荷によるJNK活性化の過程に関与する蛋白質として、その他にJIK（DPKとも呼ぶ。）が知られている。JIKは、IRE1およびTRAF2と結合し、ERストレスの負荷によるJNK活性化に関与していると考えられている。

例えば、JIKの過剰発現はERストレスの負荷によるJNK活性化を増強し、JIKの活性部位欠失変異体はERストレスの負荷によるJNK活性化を抑制する（非特許文献15）。

JIKは、イーストSte20p蛋白質のヒト相同体であるSTE20に関連した5 セリン／スレオニンキナーゼ（STE20-related serine/threonine kinase）の一つである。JIKについては上記作用の他に、例えば、上皮増殖因子（EGF）刺激によるJNK活性化を阻害し、その際JIK自身の活性も抑制される（非特許文献16）こと、また、JIKの過剰発現がJNKの活性化を引き起こす（非特許文献17）ことが報告されている。

一方、ERストレスの過剰負荷により、アポトーシスが誘導されることが知られている。虚血またはポリグルタミンやアミロイド $\beta$ （以下、A $\beta$ と略称する。）などの異常蛋白質の蓄積は、ERストレスを生じさせると考えられることから、ERストレスの負荷による神経細胞死と神経変性疾患との関わりが指摘されている。

ERストレスの負荷によるアポトーシスが、MKK4およびMKK7の各々のドミナントネガティブ変異体により抑制されたことから（非特許文献18）、ERストレスの負荷によるアポトーシス誘導に、MKK4またはMKK7を介したJNK活性化が関与している可能性がある。

以下に、本明細書で引用した文献を列記する。

特許文献1：国際公開第WO01/67299号公報。

20 非特許文献1：Eilers A. et al., J. Neurosci. (1998) 18: 1713-1724。

非特許文献2：Ham J. et al., Neuron (1995) 14: 927-939。

25 非特許文献3：Yang D. et al., Nature (1997) 389: 865-870。

非特許文献4：Moriguchi T. et al., EMBO J. (1997) 16: 7045-7053。

非特許文献5: Foltz I. et al., J. Biol. Chem. (1998) 273: 9344-9351。

非特許文献6: Yang D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1997) 94: 3004-3009。

5 非特許文献7: Bagrodia S. et al., J. Biol. Chem. (1995) 270: 27995-27998。

非特許文献8: Brown J. et al., Curr. Biol. (1996) 6: 598-605。

非特許文献9: Frost J. et al., Mol. Cell. Biol. (1996) 16: 3707-3713。

非特許文献10: Abo A. et al., EMBO J. (1998) 17: 6527-6540。

非特許文献11: Bazenet C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1998) 95: 3984-3989。

15 非特許文献12: Foltz I. et al., J. Biol. Chem. (1998) 273: 9344-9351。

非特許文献13: Urano F. et al., J. Cell Sci. (2000) 113: 3697-3702。

非特許文献14: Urano F. et al., Science (2000) 287: 664-666。

非特許文献15: Yoneda T. et al., J. Biol. Chem. (2001) 276: 13935-13940。

非特許文献16: Tassi E. et al., J. Biol. Chem. (1999) 274: 33287-33295。

25 非特許文献17: Zhang W. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. (2000) 274: 872-879。

非特許文献18: Zhang C. et al., Biochem. Biophys.

Res. Commun. (2001) 289: 718-724.

非特許文献19：細胞工学、2001年、第20巻、第11号、特集：神経変性疾患の発症メカニズムと治療への展望。

## 5 発明の開示

このような現状を鑑みると、各種ストレスによるJNK活性化機構のいずれかの段階を阻害することは、JNKの活性化によって引き起こされるアポトーシスに基づく疾患、具体的には神経変性疾患などの解明並びに防止および／または治療を可能にすると考えられる。その一例として、MKK7と相互作用する機能を有する蛋白質を見  
10 出して、MKK7の活性化を阻害することはJNKの活性化を阻害することとなる。

本発明者らは、MKK7がPAK4またはJIKと相互作用することをインシリコ(in silico)で予測して、実験的に証明し、該相互作用の結果、PAK4またはJIKによりMKK7がリン酸化されてJNK3シグナル伝達経路を活性化することを見出して、本発明を完成した。

15 本発明の一態様は、下記i)からiv)のうちの少なくとも1つを特徴とする、JNK3によるc-Junリン酸化の阻害剤に関する；

- i) PAK4とMKK7の結合阻害、
- ii) PAK4によるMKK7のリン酸化の阻害、
- iii) JIKとMKK7の結合阻害、

20 および

- iv) JIKによるMKK7のリン酸化の阻害。

また本発明の一態様は、前記i)からiv)のうちの少なくとも1つを特徴とする、JNK3によるc-Junリン酸化の阻害方法に関する。

さらに本発明の一態様は、前記i)からiv)のうちの少なくとも1つを特徴とする、  
25 JNK3によるc-Junリン酸化に基づく疾患の防止剤および／または治療剤に関する。

さらにまた本発明の一態様は、前記i)からiv)のうちの少なくとも1つを特徴と

する、神経変性疾患の防止剤および／または治療剤に関する。

また本発明の一態様は、前記 i) から iv) のうちの少なくとも 1 つを特徴とする、 JNK 3 による c-Jun リン酸化に基づく疾患の防止方法および／または治療方法に関する。

5 さらに本発明の一態様は、前記 i) から iv) のうちの少なくとも 1 つを特徴とする、 神経変性疾患の防止方法および／または治療方法に関する。

さらにまた本発明の一態様は、 PAK 4 と MKK 7 の結合を阻害する化合物の同定方法であって、 PAK 4 と MKK 7 とが結合する条件下で、 PAK 4 および／または MKK 7 を被検化合物と接触させ、次いで、 PAK 4 と MKK 7 との結合により生じるシグナルの存在、不存在または変化を検出することにより、被検化合物が PAK 4 10 と MKK 7 との結合を阻害するか否かを決定することを含む同定方法に関する。

また本発明の一態様は、 JIK と MKK 7 の結合を阻害する化合物の同定方法であって、 JIK と MKK 7 とが結合する条件下で、 JIK および／または MKK 7 を被検化合物と接触させ、次いで、 JIK と MKK 7 との結合により生じるシグナルの存在、不存在または変化を検出することにより、被検化合物が JIK と MKK 7 との結合を阻害するか否かを決定することを含む同定方法に関する。

さらに本発明の一態様は、 PAK 4 による MKK 7 のリン酸化を阻害する化合物の同定方法であって、 PAK 4 および／または MKK 7 と被検化合物を接触させ、 MKK 7 のリン酸化を検出することのできるシグナルおよび／またはマーカーを使用する 20 系を導入し、このシグナルおよび／またはマーカーの存在、不存在または変化を検出することにより、被検化合物が PAK 4 による MKK 7 のリン酸化を阻害するか否かを決定する同定方法に関する。

さらにまた本発明の一態様は、 JIK による MKK 7 のリン酸化を阻害する化合物の同定方法であって、 JIK および／または MKK 7 と被検化合物を接触させ、 MKK 7 のリン酸化を検出することのできるシグナルおよび／またはマーカーを使用する 25 系を導入し、このシグナルおよび／またはマーカーの存在、不存在または変化を検出することにより、被検化合物が JIK による MKK 7 のリン酸化を阻害するか否かを

決定する同定方法に関する。

また本発明の一態様は、前記いずれかの同定方法によって得られた化合物に関する。

さらに本発明の一態様は、 P A K 4 とM K K 7 の結合を阻害する化合物に関する。

さらにまた本発明の一態様は、 J I K とM K K 7 の結合を阻害する化合物に関する。

5 また本発明の一態様は、 P A K 4 によるM K K 7 のリン酸化を阻害する化合物に関する。

さらに本発明の一態様は、 J I K によるM K K 7 のリン酸化を阻害する化合物に関する。

さらにまた本発明の一態様は、 P A K 4 とM K K 7 の結合阻害剤に関する。

10 また本発明の一態様は、 J I K とM K K 7 の結合阻害剤に関する。

さらに本発明の一態様は、 P A K 4 によるM K K 7 のリン酸化阻害剤に関する。

さらにまた本発明の一態様は、 J I K によるM K K 7 のリン酸化阻害剤に関する。

また本発明の一態様は、前記化合物および前記阻害剤の少なくとも 1 種以上を有効量含有してなる医薬組成物に関する。

15 さらに本発明の一態様は、前記化合物および前記阻害剤の少なくとも 1 種以上を有効量含有してなる、 J N K 3 による c - J u n リン酸化に基づく疾患の防止剤および／または治療剤に関する。

さらにまた本発明の一態様は、前記化合物および前記阻害剤の少なくとも 1 種以上を有効量含有してなる、神経変性疾患の防止剤および／または治療剤に関する。

20 また本発明の一態様は、神経変性疾患が、ポリグルタミン病、ハンチントン病、脊髄小脳失調症、球脊髄性筋萎縮症、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症、アルツハイマー病、ダウン症、パーキンソン病、L e w y 小体型痴呆症、多系統萎縮症、家族性筋萎縮性側索硬化症、進行性核上性麻痺、皮質基底核変性症、p i c k 病、ファミリアルブリティッシュ デメンチア (f a m i l i a l B r i t i s h d e m e n t i a)、クロイツフェルト-ヤコブ (C r e u t z f e l d t - J a k o b) 病、ゲルストマン-ストラッスラー (G e r s t m a n n - S t r a n s s l e r) 症候群、狂牛病 (ウシ海綿状脳症) (B S E)、またはニューロセルピン (n e u r o s e r p i

n) 封入体を伴う家族性痴呆症である前記神経変性疾患の防止剤および／または治療剤に関する。

さらに本発明の一態様は、前記化合物および前記阻害剤の少なくとも1種以上を使用することを特徴とする、JNK3によるc-Junリン酸化に基づく疾患の防止方法および／または治療方法に関する。  
5

さらにまた本発明の一態様は、前記化合物および前記阻害剤の少なくとも1種以上を使用することを特徴とする、神経変性疾患の防止方法および／または治療方法に関する。

また本発明の一態様は、神経変性疾患が、ポリグルタミン病、ハンチントン病、脊10 髓小脳失調症、球脊髄性筋萎縮症、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症、アルツハイマー病、ダウン症、パーキンソン病、Lewy小体型痴呆症、多系統萎縮症、家族性筋萎縮性側索硬化症、進行性核上性麻痺、皮質基底核変性症、pick病、ファミリアルブリティッシュ デメンチア (familial British dementia)、クロイツフェルト-ヤコブ (Creutzfeldt-Jakob) 病、ゲルス15 トマンーストランスラー (Gersmann-Strässler) 症候群、狂牛病 (ウシ海綿状脳症) (BSE)、またはニューロセルピン (neuroserpin) 封入体を伴う家族性痴呆症である前記神経変性疾患の防止方法および／または治療方法に関する。

さらに本発明の一態様は、PAK4、JIK、PAK4をコードするポリヌクレオチド、JIKをコードするポリヌクレオチド、PAK4をコードするポリヌクレオチドを含有するベクターおよびJIKをコードするポリヌクレオチドを含有するベクターから選ばれる少なくとも1つと、MKK7、MKK7をコードするポリヌクレオチドおよびMKK7をコードするポリヌクレオチドを含有するベクターから選ばれる少なくとも1つとを含んでなる試薬キットに関する。

25 さらにまた本発明の一態様は、前記同定方法に用いる試薬キットであって、PAK4、JIK、PAK4をコードするポリヌクレオチド、JIKをコードするポリヌクレオチド、PAK4をコードするポリヌクレオチドを含有するベクターおよびJIK

をコードするポリヌクレオチドを含有するベクターから選ばれる少なくとも1つと、MKK 7、MKK 7をコードするポリヌクレオチドおよびMKK 7をコードするポリヌクレオチドを含有するベクターから選ばれる少なくとも1つとを含んでなる試薬キットに関する。

5

#### 図面の簡単な説明

第1図は、MKK 7とPAK 4との相互作用をインシリコで予測した結果を示す。MKK 7とPAK 4のローカルアライメントを行い、高いスコアを示した領域を表示した。上の配列および下の配列はそれぞれ、MKK 7の部分配列およびPAK 4の部10 分配列である。

第2図は、PAK 4がインビトロでMKK 7をリン酸化したことを示す。GST—MKK 7はFLAG—PAK 4存在下でリン酸化された（レーン4）が、FLAG—PAK 4非存在下（レーン3）ではリン酸化されなかった。一方、GSTはFLAG—PAK 4存在下（レーン2）でも非存在下（レーン1）でもリン酸化されなかった。

15 図の左側に示した数値は分子量を示す。

第3図は、PAK 4とMKK 7が細胞内で結合したことを示す。図中の下段は、免疫沈降試験（IP）において、HA—MKK 7とFLAG—PAK 4とを共発現させた細胞の細胞溶解物（cell lysate）（レーン2）ではHA—MKK 7とFLAG—PAK 4を含む免疫共沈降物が検出されたが、HA—MKK 7のみを発現させた細胞の細胞溶解物（レーン1）においてはかかる免疫共沈降物が検出されなかつたことを示す。また、上段および中段はそれぞれ、各細胞溶解物におけるFLAG—PAK 4およびHA—MKK 7の発現を確認した結果を示す。免疫共沈降物の検出および発現の確認はウエスタンプロット法（WB）で行った。

第4図は、PAK 4の一過性発現によりJNK 3によるc—Junリン酸化がPAK 4の発現量に依存して増強されたことを示す。図中の下段は、キナーゼアッセイ（kinase assay）において、HA—PAK 4とFLAG—JNK 3とを共発現させた細胞の細胞溶解物（レーン2—4）によりGST—c—Jun（1—79）

がリン酸化されたが、FLAG-JNK3のみ発現させた細胞の細胞溶解物（レーン1）ではGST-c-Jun（1-79）はリン酸化されなかったことを示す。レーン2、レーン3およびレーン4はそれぞれ、HA-PAK4発現ベクター（p c DN A-HA-PAK4）を0.1  $\mu$ g、0.5  $\mu$ g、および2.0  $\mu$ gトランスフェクションした結果を示す。また、上段および中段はそれぞれ、FLAG-JNK3およびHA-PAK4の発現を確認した結果を示す。発現の確認はウエスタンプロット法（WB）で行った。

第5図は、MKK7とJIKとの相互作用をインシリコで予測した結果を示す。MKK7とJIKのローカルアライメントを行い、高いスコアを示した領域を表示した。10 上の配列および下の配列はそれぞれ、MKK7の部分配列およびJIKの部分配列である。

第6図は、JIKがインビトロでMKK7をリン酸化したことを示す。GST-MKK7はHA-JIK存在下でリン酸化された（レーン2）が、HA-JIK非存在下（レーン1）ではリン酸化されなかった。一方、GSTはHA-JIK存在下（レーン3）でリン酸化されなかった。図の左側に示した数値は分子量を示す。15

第7図は、JIKとMKK7が細胞内で結合したことを示す。図中の下段は、免疫沈降試験（IP）において、FLAG-MKK7とHA-JIKとを共発現させた細胞の細胞溶解物（cell lysate）（レーン2）ではFLAG-MKK7とHA-JIKを含む免疫共沈降物が検出されたが、FLAG-MKK7のみを発現させた細胞の細胞溶解物（レーン1）においてはかかる免疫共沈降物が検出されなかったことを示す。また、上段および中段はそれぞれ、各細胞溶解物におけるHA-JIKおよびFLAG-MKK7の発現を確認した結果を示す。免疫共沈降物の検出および発現の確認はウエスタンプロット法（WB）で行った。

第8図は、JIKの一過性発現によりJNK3によるc-Junリン酸化が増強されたことを示す。HA-JIKおよびFLAG-JNK3のいずれも非発現の細胞の細胞溶解物（レーン1）並びにFLAG-JNK3のみ発現させた細胞の細胞溶解物（レーン2）ではGST-c-Jun（1-79）がほとんどリン酸化されなかった

のに対し、HA-JIKとFLAG-JNK3を共発現させた細胞の細胞溶解物（レン3）ではGST-c-Jun（1-79）のリン酸化が認められた。

#### 発明を実施するための最良の形態

5 本発明は、参照によりここに援用されるところの、日本国特許出願番号第2002-190909号および同第2002-190910号からの優先権を請求するものである。

本明細書中で使用されている技術的および科学的用語は、別途定義されていない限り、当業者により普通に理解される意味を持つ。本明細書中では当業者に既知の種々の方法が参照されている。そのような引用されている公知の方法を開示する刊行物などの資料は、引用により、本明細書中にそれらの全体が完全に記載されているものと見なす。

以下、本発明について、発明の実施の態様をさらに詳しく説明する。以下の詳細な説明は例示であり、説明のためのものに過ぎず、本発明を何ら限定するものではない。

15 本発明においては、MKK7と相互作用する機能を有する蛋白質を国際公開第WO 01/67299号公報（特許文献1）記載の方法に従って予測し、その結果2つの蛋白質を見出した。これら蛋白質は、p21活性化キナーゼ4（以下、PAK4と略称する。）およびSTE20に関連したセリン/スレオニンキナーゼの一つであるJIKである。そして、実験的に、PAK4およびJIKがそれぞれMKK7と結合すること、さらにPAK4およびJIKがそれぞれ直接MKK7をリン酸化することを初めて見出した。また、PAK4またはJIKの発現により、c-Jun-N末端キナーゼ3（以下、JNK3と略称する。）が活性化されてc-Junがリン酸化されることを明らかにした。これらから、PAK4およびJIKがそれぞれMKK7を直接リン酸化することによりJNK3シグナル伝達経路が活性化されることが判明した。

25 本明細書においてMKK7と相互作用する機能を有する蛋白質とは、MKK7と特異的に作用し合う蛋白質、具体的には例えばその機能の1つとして特異的にMKK7と結合する蛋白質を意味する。より具体的には、その機能の1つとしてMKK7をリ

ン酸化し得る蛋白質を意味する。本明細書においてはアミノ酸を表記する場合、1文字または3文字にて表記することがある。

PAK 4についてはこれまでに、低分子量GTP蛋白質の1つである cdc42 により活性化されること（非特許文献10）が知られている。また、活性化型 cdc42 が神経細胞死を誘導すること（非特許文献11）、および活性化型 cdc42 または PAK 4 が JNK シグナル伝達経路を活性化することが報告されている（非特許文献7および10）。

本発明において明らかにした知見およびこれら公知の知見から、cdc42 が PAK 4 を活性化し、活性化された PAK 4 が MKK7 に結合して直接リン酸化してこれを活性化させ、その結果 JNK3 が活性化して c-Jun をリン酸化し、最終的に何らかの生理機能が発現するというシグナル伝達経路が存在すると考えた。該生理機能としては、例えばアポトーシスの誘導など、より具体的には神経細胞死の誘導などが例示できる。このことから、PAK 4 と MKK7 の結合および／または PAK 4 による MKK7 のリン酸化を阻害することにより、JNK3 の活性化による c-Jun のリン酸化を阻害することができ、ひいては神経細胞死を阻害することが可能である。さらに、JNK3 シグナル伝達経路の活性化により引き起こされる疾患、例えば cdc42 が介在する JNK3 シグナル伝達経路の活性化に基づく疾患の防止および／または治療が可能である。

JIK は、ERストレスの負荷による JNK 活性化に関与していると考えられている。例えば、JIK の過剰発現が ERストレスの負荷による JNK 活性化を増強すること、また JIK の活性部位欠失変異体が ERストレスの負荷による JNK 活性化を抑制したことが報告されている（非特許文献15）。

本発明において明らかにした知見およびこれら公知の知見から、ERストレスの負荷による生理機能の発現には、ERストレスの負荷により JIK が活性化され、活性化された JIK が MKK7 に結合して直接リン酸化してこれを活性化させ、その結果 JNK3 が活性化して c-Jun をリン酸化するというシグナル伝達経路が存在していると考えた。該生理機能としては、例えばアポトーシスの誘導など、より具体的に

は神経細胞死の誘導などが例示できる。このことから、J I KとM K K 7の結合および／またはJ I KによるM K K 7のリン酸化を阻害することにより、J N K 3の活性化によるc-J u nのリン酸化を阻害することができ、ひいては神経細胞死を阻害することが可能である。さらに、J N K 3シグナル伝達経路の活性化により引き起こされる疾患、例えばc d c 4 2が介在するJ N K 3シグナル伝達経路の活性化に基づく疾患の防止および／または治療が可能である。

J N K 3シグナル伝達経路の活性化によって引き起こされる疾患としては、例えばアポトーシスに基づく疾患、具体的には、神経変性疾患などが挙げられる。神経変性疾患としては、次に挙げる例に限定されるものではないが、ポリグルタミン病（例えばハンチントン病、脊髄小脳失調症、球脊髄性筋萎縮症、および歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症など）、アルツハイマー病、ダウン症、パーキンソン病、L e w y小体型痴呆症、多系統萎縮症、家族性筋萎縮性側索硬化症、進行性核上性麻痺、皮質基底核変性症、p i c k病、ファミリアル ブリティッシュ デメンチア（f a m i l i a l B r i t i s h d e m e n t i a）、クロイツフェルト-ヤコブ（C r e u t z f e l d - J a k o b）病、ゲルストマン-ストラッスラー（G e r s t m a n n - S t r a n s s l e r）症候群、狂牛病（ウシ海綿状脳症）（B S E）、およびニューロセルピン（n e u r o s e r p i n）封入体を伴う家族性痴呆症などを挙げができる（非特許文献19）。またこの他に、ERストレスの負荷が関与している虚血や再灌流による神経細胞死の防止および／または治療が可能である。

本発明においては、下記i)からiv)のうちの少なくとも1つを特徴とする、J N K 3によるc-J u nリン酸化の阻害剤、J N K 3によるc-J u nリン酸化の阻害方法、さらにはJ N K 3によるc-J u nのリン酸化に基づく疾患、例えば神経変性疾患などの防止剤および／または治療剤並びに防止方法および／または治療方法を提供可能である；i) P A K 4とM K K 7の結合阻害；ii) P A K 4によるM K K 7のリン酸化の阻害；iii) J I KとM K K 7の結合阻害；およびiv) J I KによるM K K 7のリン酸の阻害。

本発明においては、上記知見に基づいて、P A K 4とM K K 7の結合および／また

は PAK 4 による MKK 7 のリン酸化を阻害する化合物、あるいは JIK と MKK 7 の結合および／または JIK による MKK 7 のリン酸化を阻害する化合物の同定方法を提供する。該同定方法は、自体公知の医薬品スクリーニングシステムを利用して構築可能である。化合物の同定に使用する PAK 4、JIK および MKK 7 は、これらを遺伝子工学的手法で発現させた細胞、無細胞系合成産物、化学合成産物、または該細胞や生体試料から調製したものであってよく、これらからさらに精製されたものであってもよい。また、PAK 4 または JIK と MKK 7 との結合およびこれら蛋白質の機能、例えばキナーゼ活性が阻害されなければ、N 末端側や C 末端側に別の蛋白質やペプチドなどを直接的にまたはリンカーペプチドなどを介して間接的に遺伝子工学的手法などを用いて付加することにより標識化したものであってもよい。あるいは、化学修飾物質により標識化したものであってもよい。好ましくは、それらの基本的な性質が阻害されないような標識化が望ましい。付加する蛋白質やペプチドなどとしては、例えばグルタチオン・S-トランスフェラーゼ、β-ガラクトシダーゼ、ホースラディッシュ・パーオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼなどの酵素類、His-tag、Myctag、HA-tag、FLAG-tag または Xpress-tag などのタグペプチド類、マルトース結合蛋白質、および免疫グロブリンのFc 断片などが挙げられる。また、標識化に用いる化学修飾物質としては、グリーン蛍光蛋白質、フルオレセインイソチオシアネート (fluorescein isothiocyanate) またはフィコエリスリン (phycoerythrin) などの蛍光物質類、ビオチン、あるいは放射性同位元素などを例示できる。標識化するとき、これら蛋白質やペプチドなどは単独で付加してもよいし複数を組み合わせて付加することもできる。これら標識化に用いた蛋白質またはペプチドなどの物質自体、またはその機能を測定することにより、例えば PAK 4 若しくは JIK と MKK 7 との結合を検出することが可能になる。被検化合物としては、例えば化学ライブラリー や天然物由来の化合物、または PAK 4、JIK および MKK 7 の一次構造や立体構造に基づいてドラッグデザインして得られた化合物などが挙げられる。

例えば、PAK 4 と MKK 7 との結合を可能にする条件を選択し、該条件下で P A

K 4、MKK 7 および被検化合物を接觸させ、次いで、PAK 4 と MKK 7 との結合を検出することのできるシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を導入し、このシグナルおよび／またはマーカーの存在、不存在、またはその変化を検出することにより、PAK 4 と MKK 7 の結合を阻害する化合物を同定可能である。例えばPA  
5 K 4 と MKK 7 との結合により生じるシグナルまたは該結合のマーカーが、被検化合物を PAK 4 および MKK 7 と接觸させたときに消失あるいは低減するなどの変化を示した場合、当該被検化合物は PAK 4 および MKK 7 との結合を阻害するものであると判定できる。かかる同定方法において、被検化合物を PAK 4 および／または MKK 7 と予め接觸させ、その後に PAK 4 と MKK 7 の結合反応を行うことも可能である。こ  
10 こでシグナルとは、そのもの自体がその物理的または化学的性質により直接検出され得るものを探し、マーカーとはそのものの物理的または生物学的性質を指標として間接的に検出され得るものを探す。シグナルとしてはルシフェラーゼ、グリーン蛍光蛋白質、および放射性同位体など、マーカーとしては、レポーター遺伝子、例えばクロ  
15 ラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子など、または検出用のエピトープタグ、例えば 6 × His-tag など、公知のものが利用できる。これらシグナルまたはマーカーの検出方法は当業者には周知のものである。

具体的には、例えば PAK 4 または MKK 7 の一方を固相化し、他方をシグナルで標識化して用いて結合反応を行い、標識シグナルを定量的に測定するといった当業者に知られた一般的なインビトロ (in vitro) における結合実験系に、被検化合物を加えて評価することにより、PAK 4 と MKK 7 の結合を阻害する化合物を得ることができる。

あるいは、PAK 4 により MKK 7 がリン酸化される条件を選択し、該条件下で PAK 4 および MKK 7 と被検化合物とを接觸させ、MKK 7 のリン酸化を検出することのできるシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を導入し、このシグナルおよび／またはマーカーの存在若しくは不存在または変化を検出することにより、PAK 4 による MKK 7 のリン酸化を阻害する化合物を同定できる。例えば PAK による  
25 MKK 7 のリン酸化により生じるシグナルまたは該リン酸化のマーカーが、被検化

物を P A K 4 および M K K 7 と接触させたときに消失あるいは低減するなどの変化を示した場合、当該被検化合物は P A K による M K K 7 のリン酸化を阻害するものであると判定できる。かかる同定方法において、被検化合物を P A K 4 および／または M K K 7 と予め接触させ、その後に P A K 4 による M K K 7 のリン酸化反応を行うこと 5 も可能である。蛋白質リン酸化試験およびリン酸化蛋白質の定量は、自体公知の方法により実施可能である。簡便には、例えば後述する実施例に記載したように P A K 4 と M K K 7 とを放射性同位体 ( $^{32}P$ ) で標識したアデノシン三リン酸 (A T P) の存在下でインビトロで反応させ、反応後に S D S - P A G E により蛋白質の分離を行い、得られた蛋白質のバンドを染色して検出し、リン酸化された M K K 7 に相当するバンド 10 の放射活性を測定することにより蛋白質リン酸化試験およびリン酸化蛋白質の定量を実施できる。

または、 P A K 4 および M K K 7 を共発現させた細胞を用い、該細胞と被検化合物とを接触させ、 P A K 4 と M K K 7 の結合または P A K 4 による M K K 7 のリン酸化を検出することのできるシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を導入し、このシグナルおよび／またはマーカーの存在若しくは不存在または変化を検出すること 15 により、 P A K 4 と M K K 7 の結合および／または P A K 4 による M K K 7 のリン酸化を阻害する化合物を同定できる。

上記細胞を使用した同定方法は、上記インビトロでの同定方法と組み合わせて使用できる。当該インビトロの同定方法により得られた P A K 4 と M K K 7 の結合および／または P A K 4 による M K K 7 のリン酸化を阻害する化合物を、細胞を使用した上記同定方法で再度試験することにより、有用な化合物をさらに選択し得る。 20

上記同定方法において、 P A K 4 の代わりに J I K を用いることにより同様に、 J I K と M K K 7 の結合および／または J I K による M K K 7 のリン酸化を阻害する化合物を同定可能である。

25 本発明にかかる同定方法においては、 P A K 4 と M K K 7 の結合を阻害する化合物、 J I K と M K K 7 の結合を阻害する化合物、 P A K 4 による M K K 7 のリン酸化を阻害する化合物、および J I K による M K K 7 のリン酸化を阻害する化合物を得ること

ができる。これら化合物もまた、本発明の範囲に包含される。これら化合物は、PAK4とMKK7の結合阻害剤、PAK4によるMKK7のリン酸化の阻害剤、JIKとMKK7の結合阻害剤、またはJIKによるMKK7のリン酸化の阻害剤として利用可能である。このような化合物としては、両蛋白質が相互作用する部位、例えば結合部位のアミノ酸配列からなるペプチドまたはオリゴペプチドを例示できる。このようなペプチドまたはオリゴペプチドは、PAK4またはMKK7のアミノ酸配列から設計し、自体公知のペプチド合成法によって合成し、上記同定方法においてPAK4とMKK7の結合、PAK4によるMKK7のリン酸化、JIKとMKK7の結合、またはJIKによるMKK7のリン酸化を阻害するか否かを試験することにより同定可能である。また、PAK4とMKK7の結合を阻害し得る抗体またはJIKとMKK7の結合を阻害し得る抗体も上記化合物の1つとして例示できる。かかる抗体は、PAK4、JIKまたはMKK7に対する抗体を作成し、得られた抗体からPAK4とMKK7の結合またはJIKとMKK7の結合を阻害し得るものを選択することにより取得可能である。抗体の作製は、抗原として例えば、PAK4、JIKおよびMKK7の各蛋白質自体、またはPAK4とMKK7若しくはJIKとMKK7が相互作用する部位のアミノ酸配列を含むペプチド若しくはオリゴペプチドを用いて、自体公知の抗体作製法により行うことができる。

上記選別された化合物、上記結合阻害剤および上記リン酸化阻害剤は、さらに生物学的有用性と毒性のバランスを考慮して選別することによって、PAK4とMKK7の結合、JIKとMKK7の結合、PAK4によるMKK7のリン酸化、またはJIKによるMKK7のリン酸化を阻害することに基づく医薬の有効成分として有用である。PAK4およびJIKはいずれも、MKK7に結合すると直接MKK7をリン酸化してこれを活性化し、その結果JNK3が活性化してc-Junがリン酸化される。従って、上記化合物、上記結合阻害剤および上記リン酸化阻害剤は、JNK3によるc-Junリン酸化に基づく医薬、例えばアポトーシスに基づく疾患、具体的には神経変性疾患などに対する医薬の有効成分として用いることができる。

本発明に係る医薬は、上記選別された化合物、上記結合阻害剤および上記リン酸化

阻害剤のうちの少なくとも 1 つを有効量含む医薬となしてもよいが、通常は、1 種または 2 種以上の医薬用担体または賦形剤を用いて医薬組成物を製造することが好ましい。かかる担体としては、生理食塩水、緩衝化生理食塩水、デキストロース、水、グリセロール、およびそれらの混合物が挙げられるが、これらに限らない。

必要な用量範囲は、上記化合物、上記結合阻害剤および上記リン酸化阻害剤の有効性、投与形態、疾病の種類、対象の性質（体重、年齢、病状および他の医薬の使用の有無など）、および担当医師の判断により適宜選択することが望ましい。具体的には、適当な用量は、例えば対象の体重 1 kg あたり 0.1  $\mu$ g ないし 100  $\mu$ g の範囲であることが好ましい。しかしながら、当該分野においてよく知られた最適化のための一般的な常套的実験を用いてこれらの用量の変更を行うことができる。上記投与量は 1 日 1 ～ 4 回に分けて投与することができ、数日または数週間に 1 回の割合で間欠的に投与してもよい。

処方は投与形態に適したものを選択すればよく、該処方は当業者によく知られたものを用いればよい。また、処方するときには、これらを単独で使用してもよく、あるいは治療に必要な他の化合物または医薬と共に使用してもよい。例えば、c—Jun リン酸化阻害剤または神経変性疾患の防止剤および／または治療剤などの有効成分を配合してもよい。

投与形態は、全身投与または局所投与のいずれも選択することができる。この場合、疾患、症状などに応じた適当な投与形態を選択する。例えば、通常の静脈内投与、動脈内投与のほか、皮下、皮内、筋肉内などに投与することもできる。腸溶処方またはカプセル処方がうまく処方されるならば、経口投与も可能である。さらに、胆汁酸塩またはフシジン酸または他の界面活性剤のような浸透剤を用いる経粘膜投与若しくは経皮投与を用いることもできる。局所的な投与においては、膏薬、パスタ、ゲルなどの形態での投与であってもよい。

製剤化にあたっては、その投与形態あるいは有効成分の物性に応じて適切な製剤用添加物を用いることができ、常法に従って製剤化することができる。具体的には、例えば散剤、丸剤、錠剤、カプセル製剤、水溶液製剤、エタノール溶液製剤、リポソーム

ム製剤、脂肪乳剤、シクロデキストリンなどの包接体などの製剤化方法が利用できる。

散剤、丸剤、カプセル剤および錠剤は、ラクトース、グルコース、シュークロース、マンニトールなどの賦形剤、澱粉、アルギン酸ソーダなどの崩壊剤、マグネシウムステアレート、タルクなどの滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチンなどの結合剤、脂肪酸エステルなどの界面活性剤、グリセリンなどの可塑剤などを用いて製造できる。錠剤やカプセルを製造するには、固体の製薬担体が用いられる。

懸濁剤は、水、シュークロース、ソルビトール、フラクトースなどの糖類、ポリエチレングリコールなどのグリコール類、油類を使用して製造できる。

10 注射用の溶液は、塩溶液、グルコース溶液、または塩水とグルコース溶液の混合物からなる担体を用いて調製可能である。

リポソーム化は、例えばリン脂質を有機溶媒（クロロホルムなど）に溶解した溶液に、当該物質を溶媒（エタノールなど）に溶解した溶液を加えた後、溶媒を留去し、これにリン酸緩衝液を加え、振盪、超音波処理および遠心分離した後、上清を濾過処理して回収することにより行い得る。

20 脂肪乳剤化は、例えば当該物質、油成分（大豆油、ゴマ油、オリーブ油などの植物油、MCTなど）、乳化剤（リン脂質など）などを混合、加熱して溶液とした後に、必要量の水を加え、乳化機（ホモジナイザー、例えば高圧噴射型や超音波型など）を用いて、乳化・均質化処理して行い得る。また、これを凍結乾燥化することも可能である。なお、脂肪乳剤化するとき、乳化助剤を添加してもよく、乳化助剤としては、例えばグリセリンや糖類（例えばブドウ糖、ソルビトール、果糖など）が例示される。

シクロデキストリン包接化は、例えば当該物質を溶媒（エタノールなど）に溶解した溶液に、シクロデキストリンを水などに加温溶解した溶液を加えた後、冷却して析出した沈殿を濾過し、滅菌乾燥することにより行い得る。この際、使用されるシクロデキストリンは、当該物質の大きさに応じて、空隙直徑の異なるシクロデキストリン（ $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 型）を適宜選択すればよい。

本発明は、試薬キットであって、PAK4、JIK、PAK4をコードするポリヌ

クレオチド、JIKをコードするポリヌクレオチド、PAK4をコードするポリヌクレオチドを含有するベクターおよびJIKをコードするポリヌクレオチドを含有するベクターから選ばれる少なくとも1つと、MKK7、MKK7をコードするポリヌクレオチドおよびMKK7をコードするポリヌクレオチドを含有するベクターから選ばれる少なくとも1つとを含んでなる試薬を提供する。本発明にかかる試薬キットは、上記同定方法に使用することができる。JIK、PAK4およびMKK7は、これらを遺伝子工学的手法で発現させた細胞、無細胞系合成産物、化学合成産物、または当該細胞や生体試料から調製したものであってよく、これらからさらに精製されたものであってもよい。また、JIKまたはPAK4とMKK7の結合およびこれら蛋白質の機能、例えばキナーゼ活性が阻害されなければ、N末端側やC末端側に別の蛋白質やペプチドなどを直接的にまたはリンカーペプチドなどを介して間接的に遺伝子工学的手法などを用いて付加することにより標識化したものであってもよい。あるいは、化学修飾物質により標識化したものであってもよい。好ましくは、それらの基本的な性質が阻害されないような標識化が望ましい。付加する蛋白質やペプチドなどとしては、例えばグルタチオン-S-トランスフェラーゼ、β-ガラクトシダーゼ、ホースラディッシュ・パーオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼなどの酵素類、His-tag、Myc-tag、HA-tag、FLAG-tagまたはXpress-tagなどのタグペプチド類、マルトース結合蛋白質、および免疫グロブリンのFc断片などが挙げられる。また、標識化に用いる化学修飾物質としては、グリーン蛍光蛋白質、フルオレセインイソチオシアネートまたはフィコエリスリンなどの蛍光物質類、ビオチン、あるいは放射性同位元素などを例示できる。標識化するとき、これら蛋白質やペプチドなどは単独で付加してもよいし複数を組み合わせて付加することもできる。PAK4、JIKまたはMKK7のいずれかをコードするポリヌクレオチドは、ヒトcDNAライブラリーから自体公知の遺伝子工学的手法により調製することができる。PAK4、JIKまたはMKK7のいずれかをコードするポリヌクレオチドを含有するベクターは、上記ポリヌクレオチドを適当な発現ベクターDNA、例えば細菌プラスミド由来のベクターに自体公知の遺伝子工学的手法で導入することに

より得られる。これらは試薬であるとき、PAK 4 または JIK と MKK 7 の結合や PAK 4 または JIK による MKK 7 のリン酸化を検出するためのシグナルおよび／またはマーカー、バッファー、並びに塩など、必要とされる物質を含むことができる。さらに、安定化剤および／または防腐剤などの物質を含んでいてもよい。なお、製剤化にあたっては、使用する各物質それに応じた製剤化手段を導入すればよい。

### 実施例

以下、本発明を実施例に基づき具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に限定されるものではない。

10

#### 実施例 1 (MKK 7 と相互作用する機能を有する蛋白質のインシリコでの探索)

MKK 7 と相互作用する機能を有する蛋白質を、国際公開第 WO 01/67299 号公報に記載の予測方法に従って予測した。すなわち、MKK 7 のアミノ酸配列をある長さのオリゴペプチドに分解し、各オリゴペプチドのアミノ酸配列あるいはそのアミノ酸配列と相同なアミノ酸配列を持った蛋白質をデータベース中で検索し、得られた蛋白質と MKK 7 との間でローカルアライメントを行い、ローカルアライメントのスコアの高いものを MKK 7 と相互作用すると予測した。

解析の結果、MKK 7 由来の 7 アミノ酸残基または 6 アミノ酸残基からなるオリゴペプチド DVWSLGI (配列番号 1) および PPARPR (配列番号 2) と相同性 20 あるオリゴペプチド D I WSLGI (配列番号 3) および PPARAR (配列番号 4) が、PAK 4 のアミノ酸配列中に存在することが分かった。第 1 図に、MKK 7 と PAK 4 とのローカルアライメントの結果を示した。この結果から、PAK 4 は MKK 7 と相互作用する機能を有する蛋白質であると予測された。

#### 25 実施例 2 (PAK 4 による MKK 7 リン酸化の解析)

PAK 4 による MKK 7 の相互作用を実験的に確認するために、免疫複合体リン酸化法を用いたインビトロにおけるリン酸化試験を実施した。

## &lt;材料&gt;

PAK4発現プラスミドを次のように構築した。まず、ヒトPAK4cDNAを、ヒト脳由来poly(A)<sup>+</sup>RNA(Clontech社)から逆転写ポリメラーゼ連鎖反応( RT-PCR)により取得し、次いで動物細胞用発現ベクター、pcDNA5 A3.1 (+)(Invitrogen社)へ組込んだ。そのとき、5'側にFLAGタグコード配列またはHAタグコード配列を挿入し、動物細胞用N末端FLAGタグ付加型PAK4発現プラスミド(pcDNA-FLAG-PAK4)および動物細胞用N末端HAタグ付加型PAK4発現プラスミド(pcDNA-HA-PAK4)をそれぞれ構築した。

試験には、下記組成からなる各バッファーを用いた。

細胞溶解バッファー(Cell lysis buffer): 20mM Tris-HCl, pH 7.4, 150mM NaCl, 1mM エチレンジアミン四酢酸(EDTA), 1mM エチレングリコールビス四酢酸(EGTA), 1% Triton X-100, 2.5mM ピロリン酸ナトリウム(Na-pyrophosphate), 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, プロテアーゼ阻害剤カクテル(protease inhibitor cocktail)、Cell Signaling Technology社。

キナーゼバッファー(Kinase buffer): 25mM Tris-HCl, pH 7.5, 5mM β-グリセロホスフェート, 2mM ジチオスレイトール, 0.1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10mM MgCl<sub>2</sub>、Cell Signaling Technology社。

SDSサンプルバッファー(SDS sample buffer): 4% SDS, 125mM Tris-HCl, pH 6.8, 20% グリセロール, 0.01% ブロムフェノールブルー(BPB), 10% β-メルカプトエタノール(mercaptoethanol)。

## &lt;方法&gt;

細胞数  $5 \times 10^5$  の HEK 293 細胞を 37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下  $\phi 60$  mm のシヤーレ中で一晩培養した後、5 μg の p c DNA-F FLAG-PAK4 を、15 μl の FuGENE 6 トランスフェクション試薬 (FuGENE 6 Transfect ion Reagent, Roche 社) を用いてトランスフェクションした。陰性コントロールとして p c DNA 3.1 (+) を用い、同様にトランスフェクションした。2 日間培養後、細胞を氷冷したリン酸緩衝生理食塩水 (−) [PBS (−)] で洗浄して回収し、500 μl の細胞溶解バッファーに懸濁し、氷上で 10 分間放置した。ついで 4°C にて 14,000 rpm で 10 分間遠心処理してその上清を回収し、細胞溶解物 (cell lysate) とした。次に、500 μl の細胞溶解物に、アガロースに結合した正常マウス IgG (Agarose-conjugated normal mouse IgG, Sigma 社) 20 μl を加え、4°C にて 30 分間転倒混和した後、遠心処理してその上清を回収した。回収した上清に 20 μl の抗FLAG M2 アフィニティーグル (anti-FLAG M2 affinity gel, Sigma 社) を加え、4°C にて 2 時間転倒混和した後、遠心処理によりビーズを回収し、さらにこのビーズを 500 μl の細胞溶解バッファーで 2 回、500 μl のキナーゼバッファーで 2 回洗浄した。次に、ビーズに 1 μg の基質と 10 μM の ATP および 5 μCi の [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (3,000 Ci/mmol, PerkinElmer 社) を含む 25 μl のキナーゼバッファーを加え、30°C にて 30 分間リン酸化反応を行った。反応後、25 μl の 2 × SDS サンプルバッファーを加え、5 分間煮沸後、上清を SDS-PAGE により分離し、BAS 2000 (Fuji film 社) を用いたオートラジオグラフィーによりリン酸化蛋白質を検出した。なお、基質は、GST-MKK7 の不活性体 (inactive GST-MKK7, Upstate 社)、または、陰性コントロールとして GST をそれぞれ使用した。

## &lt;結果&gt;

第 2 図に示したように、PAK4 による GST-MKK7 のリン酸化が認められた。また、このリン酸化は PAK4 非存在では認められなかったことから、GST-MKK7 のリン酸化は自己リン酸化ではなく、PAK4 によるものであることが明らかと

なった。なお、陰性コントロール用の基質として用いたGSTでは、リン酸化は認められなかった。

### 実施例3 (MKK7とPAK4の結合解析)

5 PAK4とMKK7の結合を実験的に確認するために、細胞内共発現／免疫共沈降法による結合試験を実施した。

#### ＜材料＞

PAK4発現プラスミドは、実施例2で構築したものを用いた。

10 MKK7発現プラスミドは次のように構築した。まず、ヒトMKK7 cDNAを、ヒト骨格筋由来poly(A)<sup>+</sup>RNA (Clontech社)からRT-PCRにより取得し、次いで動物細胞用発現ベクター、pcDNA3.1 (+) (Invitrogen社)へ組込んだ。その際、5'側にHA-tagコード配列を挿入し、動物細胞用N末端HA-tag付加型MKK7発現プラスミド、pcDNA-HA-MKK7を構築した。

15 試験に用いた各バッファーの組成は、実施例2に記載のものと同じである。

#### ＜方法＞

細胞数 $4 \times 10^5$ のHEK293T細胞を37°C、5%CO<sub>2</sub>の条件下φ60mmシヤーレ中で一晩培養した後、2μgのpcDNA-FLAG-PAK4を2μgのpcDNA-HA-MKK7と共に、FuGENE 6 Transfection Reagent (Roche社)を用いてトランスフェクションした。陰性コントロールとしてpcDNA3.1 (+)を用い、同様にトランスフェクションした。2日間培養後、細胞を氷冷したPBS (-)で洗浄して回収し、500μlの細胞溶解バッファーに懸濁し、氷上で10分間放置した。ついで、4°Cにて14,000 rpmで10分間遠心処理してその上清を回収し、細胞溶解物とした。次に、500μlの細胞溶解物に20μlのAgarose-conjugated normal mouse IgG (Sigma社)を加え、4°Cにて30分間転倒混和した後、遠心処理してその上清を回収した。回収した上清に20μlのanti-FLAG M2

affinity gel (Sigma社) を加え、4°Cにて一晩転倒混和した後、遠心処理によりビーズを回収した。ビーズを 500 μl の細胞溶解バッファーで3回、次いで 500 μl のトリス緩衝生理食塩水 (TBS: 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl) で1回洗浄した後、20 μl の 2×SDSサンプルバッファーを加え、5分間加熱後、上清を 5-20% の SDS-PAGEにより分離した。その後、抗HA抗体 (Y-11, Santa Cruz社) を用いたウェスタンブロッティング検出キット (ECL western blotting detection kit, Amersham pharmacia biotech社) を使用した。

#### ＜結果＞

第3図に示したように、抗FLAG抗体を用いてFLAG-PAK4の免疫沈降を実施した結果、FLAG-PAK4とHA-MKK7とを共発現させた細胞においてはHA-MKK7の共沈降が認められた。一方、FLAG-PAK4非発現細胞では HA-MKK7の共沈降は認められなかったことから、この共沈降はアガロースビーズへの非特異的結合ではなく、FLAG-PAK4とHA-MKK7の結合を示すものであることが明らかとなった。これらから、PAK4とMKK7が細胞内で結合することが判明した。

#### 20 実施例4 (PAK4によるJNK3シグナル伝達経路の活性化)

PAK4によるJNK3シグナル伝達経路の活性化を実験的に確認するために、インビトロにおけるJNK3リン酸化試験を、免疫複合体リン酸化法を用いて実施した。

#### ＜材料＞

PAK4発現プラスミドは、実施例2で構築したものを用いた。

25 JNK3発現プラスミドは次のように構築した。まず、ヒトJNK3 cDNAを、ヒト海馬cDNAライブラリーからRT-PCRにより取得し、次いで動物細胞用発現ベクター、pCDNA3.1 (+) (Invitrogen社) へ組込んだ。その際、

5'側にFLAG-tagコード配列を挿入し、動物細胞用N末端FLAG-tag付加型JNK3発現プラスミド、pcDNA-FLAG-JNK3を構築した。

また、c-Jun (1-79) (c-JunのN末端79アミノ酸領域であり、JNKによるリン酸化部位を含む) を、N末端にGST (Glutathione S-transferase) を付加した融合蛋白質〔以下、GST-c-Jun (1-79)〕として大腸菌にて発現後、グルタチオンセファロース4B (Glutathione sepharose 4B, Amersham Pharmacia biotech社) で精製し、使用した。

試験に用いた各溶液の組成は、実施例2に記載のものと同じである。

10 <方法>

細胞数  $6 \times 10^5$  のHEK293細胞を37°C、5%CO<sub>2</sub>の条件下φ60mmのシャーレ中で一晩培養した後、pcDNA-FLAG-JNK3 (2μg) とpcDNA-HA-PAK4 (0, 0.1, 0.5、または2μg) を12μlのFuGENE 6 Transfection Reagent (Roche社) を用いてトランスクエクションした。なお、DNAの総量はpcDNA3.1 (+) を用いて全て4μgに調整した。2日間培養後、細胞を氷冷したPBS (-) で洗浄して回収後、500μlの細胞溶解バッファーに懸濁し、氷上で10分間放置した。ついで、4°Cにて14,000 rpmで10分間遠心処理してその上清を回収し、細胞溶解物とした。次に、500μlの細胞溶解物に20μlのAgarose-conjugated normal mouse IgG (Sigma社) を加え、4°Cにて30分間転倒混和した後、遠心処理してその上清を回収した。回収した上清に20μlのanti-FLAG M2 affinity gel (Sigma社) を加え、4°Cにて2時間転倒混和した後、遠心処理によりビーズを回収し、さらにビーズを500μlの細胞溶解バッファーで2回、500μlのキナーゼバッファーで2回洗浄した。次に、ビーズに基質として2μgのGST-c-Jun (1-79) と10μM ATPおよび5μCiの[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (3,000Ci/mmol, PerkinElmer社) を含む25μlのキナーゼバッファーを加え、30°Cにて30分間リン酸

化反応を行った。反応後、25 μl の2×SDSサンプルバッファーを加え、100°C にて5分間処理後、上清を5-20% SDS-PAGEにより分離し、BAS 2000 (Fuji film社) を用いたオートラジオグラフィーによりリン酸化されたGST-c-Jun (1-79) を検出した。なお、各蛋白質の発現は、抗FLAG 5 G M2モノクローナル抗体 (Sigma社) または抗HA抗体 (Y-11, Santacruz社) を用いたウェスタンプロット法により確認した。

#### <結果>

第4図に示すように、HA-PAK4とFLAG-JNK3を共発現させた細胞の溶解物を用いたキナーゼアッセイにおいて、HA-PAK4の発現量に依存して、リン酸化c-Junが増加した。すなわち、HA-PAK4の発現により、JNK3のc-Junリン酸化活性が上昇することが明らかになった。FLAG-JNK3の発現量には大きな変動がないことから、JNK3活性の上昇はHA-PAK4の発現によるものと考えられる。

実施例2、3および4で得られた結果から、PAK4がMKK7に結合してこれを直接リン酸化することにより、JNK3が活性化されてc-Junがリン酸化されること、すなわちJNK3シグナル伝達経路が活性化されることが判明した。

#### 実施例5 (MKK7と相互作用する機能を有する蛋白質のインシリコでの探索)

MKK7と相互作用する機能を有する蛋白質を、実施例1と同様の方法で予測した。20 その結果、MKK7由来の6アミノ酸残基からなるオリゴペプチド、WSLGIS (配列番号5) およびLEAKLK (配列番号6)、と相同性のあるオリゴペプチド、WSLGIT (配列番号7) およびLENKLK (配列番号8) が、JIKのアミノ酸配列中に存在することが分かった。第5図に、MKK7とJIKとのローカルアライメントの結果を示した。この結果から、JIKはMKK7と相互作用する機能を有する蛋白質であると予測された。

#### 実施例6 (JIKによるMKK7リン酸化の解析)

JIKによるMKK7のリン酸化を実験的に確認するために、免疫複合体リン酸化法を用いたインビトロにおけるリン酸化試験を実施した。

＜材料＞

JIK発現プラスミドを次のように構築した。まず、ヒトJIK cDNAを、ヒト腎臓由来poly(A)<sup>+</sup>RNA (Clontech社) からRT-PCRにより取得し、次いで動物細胞用発現ベクター、pcDNA3.1 (+) (Invitrogen社) へ組込んだ。そのとき、5'側にHA-tagコード配列を挿入し、動物細胞用N末端HA-tag付加型JIK発現プラスミド、pcDNA-HA-JIKを構築した。なお、クローニングしたJIK cDNAのアミノ酸翻訳配列は、NCBI (National Center for Biotechnology Information) の蛋白質データベースに開示されたアクセション番号XP\_045006 (登録遺伝子名: JIK) のものと同一である。

試験に用いた各バッファーの組成は、実施例2に記載のものと同じである。

＜方法＞

細胞数 $4 \times 10^5$ のHEK293T細胞を37°C、5%CO<sub>2</sub>の条件下φ60mmのシャーレ中で一晩培養した後、5μgのpcDNA-HA-JIKを、15μlのFUGENE6 Transfection Reagent (Roche社) を用いてトランスフェクションした。陰性コントロールとしてpcDNA3.1 (+) を用い、同様にトランスフェクションした。2日間培養後、細胞を氷冷したPBS (-) で洗浄して回収し、500μlの細胞溶解バッファーに懸濁し、氷上で10分間放置した。ついで4°Cにて14,000 rpmで10分間遠心処理してその上清を回収し、細胞溶解物とした。次に、500μlの細胞溶解物に、Agarose-conjugated normal mouse IgG (Sigma社) 20μlを加え、4°Cにて30分間転倒混和した後、遠心処理してその上清を回収した。回収した上清に20μlの抗HAアフィニティーマトリックス (anti-HA affinity matrix, Roche社) を加え、4°Cにて2時間転倒混和した後、遠心処理によりビーズを回収し、さらにこのビーズを500μlの細胞溶解バッファーで2

回、500 μlのキナーゼバッファーで2回洗浄した。次に、ビーズに1 μgの基質と10 μMのATPおよび5 μCiの[γ-<sup>32</sup>P]ATP (3,000 Ci/mmole, PerkinElmer社)を含む25 μlのキナーゼバッファーを加え、30℃にて30分間リン酸化反応を行った。反応後、25 μlの2×SDSサンプルバッファーを加え、5分間煮沸後、上清をSDS-PAGEにより分離し、BAS 2000 (Fuji film社)を用いたオートラジオグラフィーによりリン酸化蛋白質を検出した。なお、基質は、GST-MKK7の不活性体 (unactive GST-MKK7, Upstate社)、または、陰性コントロールとしてGSTをそれぞれ使用した。

10 <結果>

第6図に示したように、JIKによるGST-MKK7のリン酸化が認められた。また、このリン酸化はJIK非存在下では認められなかったことから、GST-MKK7のリン酸化は自己リン酸化ではなく、JIKによるものであることが明らかとなった。なお、陰性コントロール用の基質として用いたGSTでは、リン酸化は認められなかった。

実施例7 (MKK7とJIKの結合解析)

JIKとMKK7の結合を実験的に確認するために、細胞内共発現/免疫共沈降法による結合試験を実施した。

20 <材料>

JIK発現プラスミドは、実施例6で構築したもの用いた。

MKK7発現プラスミドは次のように構築した。まず、ヒトMKK7 cDNAを、ヒト骨格筋由来poly(A)<sup>+</sup>RNA (Clontech社)からRT-PCRにより取得し、次いで動物細胞用発現ベクター、p cDNA 3.1 (+) (Invitrogen社)へ組込んだ。その際、5'側にFLAG-tagコード配列を挿入し、動物細胞用N末端FLAG-tag付加型MKK7発現プラスミド、p cDNA-F FLAG-MKK7を構築した。

試験に用いた各バッファーの組成は、実施例2に記載のものと同じである。

＜方法＞

細胞数 $4 \times 10^5$ のHEK 293 T細胞を37°C、5%CO<sub>2</sub>の条件下 $\phi 60\text{mm}$ シヤーレ中で一晩培養した後、2 $\mu\text{g}$ のp c DNA-HA-JIKを2 $\mu\text{g}$ のp c DNA-FLAG-MKK7と共に、FuGENE 6 Transfection Reagent (Roche社) を用いてトランスフェクションした。陰性コントロールとしてp c DNA 3. 1 (+) を用いて、同様にトランスフェクションした。2日間培養後、細胞を氷冷したPBS (-) で洗浄して回収し、500 $\mu\text{l}$ の細胞溶解バッファーに懸濁し、氷上で10分間放置した。ついで4°Cにて14,000 rpmで10分間遠心処理してその上清を回収し、細胞溶解物とした。次に、500 $\mu\text{l}$ の細胞溶解物に20 $\mu\text{l}$ のAgarose-conjugated normal mouse IgG (Sigma社) を加え、4°Cにて30分間転倒混和した後、遠心処理してその上清を回収した。回収した上清に20 $\mu\text{l}$ のanti-HA affinity matrix (Roche社) を加え、4°Cにて一晩転倒混和した後、遠心処理によりビーズを回収した。ビーズを500 $\mu\text{l}$ の細胞溶解バッファーで3回、次いで500 $\mu\text{l}$ のTBS (25mM Tris-HCl, pH 7.5, 150mM NaCl) で1回洗浄した後、20 $\mu\text{l}$ の2×SDSサンプルバッファーを加え、5分間加熱後、上清を5-20%のSDS-PAGEにより分離した。その後、抗FLAG M2抗体 (Sigma社) を用いたウェスタンプロット法により結合蛋白質を検出した。なお、検出はECLウェスタンブロッティング検出キットを使用した。

＜結果＞

第7図に示したように、抗HA抗体を用いてHA-JIKの免疫沈降を実施した結果、HA-JIKとFLAG-MKK7とを共発現させた細胞においては、FLAG-MKK7の共沈降が認められた。一方、HA-JIK非発現細胞ではFLAG-MKK7の共沈降は認められなかったことから、この共沈降はアガロースビーズへの非特異的結合ではなく、HA-JIKとFLAG-MKK7の結合を示すものであることが明らかとなった。これらから、JIKとMKK7が細胞内で結合することが判明

した。

#### 実施例8 (JIKによるJNK3シグナル伝達経路の活性化)

JIKによるJNK3シグナル伝達経路の活性化を実験的に確認するために、イン

5 ビトロにおけるJNK3リン酸化試験を、免疫複合体リン酸化法を用いて実施した。

##### <材料>

JNK3発現プラスミドは、実施例4で構築したものを用いた。

JIK発現プラスミドは、実施例6で構築したものを用いた。

GST-c-Jun (1-79) は実施例4と同様に調製した。

10 試験に用いた各バッファーの組成は、実施例2に記載のものと同じである。

##### <方法>

細胞数  $4 \times 10^5$  のHEK293T細胞を37°C、5%CO<sub>2</sub>の条件下  $\phi 60\text{ mm}$  の

シャーレ中で一晩培養した後、2  $\mu\text{g}$  のpcDNA-HA-JIKを、2  $\mu\text{g}$  のpc

DNA-FLAG-JNK3と共に、FUGENE 6 Transfection

15 Reagent (Roche社) を用いてトランスフェクションした。陰性コントロ

ールとしてpcDNA3.1 (+) を用いて同様にトランスフェクションした。2日

間培養後、細胞を氷冷したPBS (-) で洗浄して回収後、500  $\mu\text{l}$  の細胞溶解バ

ッファーに懸濁し、氷上で10分間放置した。ついで4°Cにて14,000 rpmで

10分間遠心処理してその上清を回収し、細胞溶解物とした。次に、500  $\mu\text{l}$  の細

20 胞溶解物に20  $\mu\text{l}$  のagarose-conjugated normal mouse IgG (Sigma社) を加え、4°Cにて30分間転倒混和した後、遠心処

理してその上清を回収した。回収した上清に20  $\mu\text{l}$  のanti-FLAG M2

affinity gel (Sigma社) を加え、4°Cにて2時間転倒混和した後、

遠心処理によりビーズを回収し、さらにビーズを500  $\mu\text{l}$  の細胞溶解バッファーで

25 2回、500  $\mu\text{l}$  のキナーゼバッファーで2回洗浄した。次に、ビーズに基質として

2  $\mu\text{g}$  のGST-c-Jun (1-79) と10  $\mu\text{M}$  ATP および5  $\mu\text{Ci}$ の[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (3000 Ci/mmol, PerkinElmer社) を含む25

μ 1 のキナーゼバッファーを加え、30℃にて30分間リン酸化反応を行った。反応後、25 μ 1 の2×SDSサンプルバッファーを加え、100℃にて5分間処理後、上清を5-20% SDS-PAGEにより分離し、BAS 2000 (Fuji f i 1m社) を用いたオートラジオグラフィーによりリン酸化されたGST-c-Jun (1-79) を検出した。

#### <結果>

第8図に示すように、HA-JIKとFLAG-JNK3を共発現させた細胞の溶解物を用いたキナーゼアッセイにおいて、FLAG-JNK3のみを発現させた細胞の溶解物と比較してリン酸化c-Junが増加した。すなわち、HA-JIKの発現により、JNK3のc-Junリン酸化活性が上昇することが明らかになった。

実施例6、7および8で得られた結果から、JIKがMKK7に結合してこれを直接リン酸化することにより、JNK3が活性化されてc-Junがリン酸化されること、すなわちJNK3シグナル伝達経路が活性化されることが判明した。

#### 15 産業上の利用可能性

本発明においては、PAK4およびJIKがそれぞれMKK7と結合すること、さらに、PAK4およびJIKのいずれもMKK7を直接リン酸化すること、その結果JNK3シグナル伝達経路が活性されることを初めて見出した。

PAK4がJNKシグナル伝達経路を活性化することは従来知られていたが、その機構は不明であった。PAK4はcdc42によって活性化されるが、cdc42の活性化はJNKシグナル伝達経路の活性化を介して神経細胞死を引き起こす。よって、JNK3シグナル伝達経路の活性化による神経細胞死において、PAK4によるMKK7のリン酸化が関与していると考えられる。

JIKがERストレスの負荷によるJNK活性化に関与していることは今までに報告されているが、その機構は不明であった。ERストレスはJNKシグナル伝達経路の活性化を介して、神経細胞死を引き起こす。よって、ERストレスの負荷によるJNK3シグナル伝達経路の活性化による神経細胞死において、JIKによるMKK7

のリン酸化が関与していると考えられる。

したがって、PAK4またはJIKとMKK7の結合、あるいはPAK4またはJIKによるMKK7のリン酸化を阻害することにより、JNK3シグナル伝達経路の活性化によって引き起こされるc-Junのリン酸化を阻害することができ、ひいて

5 神経細胞死を阻害することができる。

PAK4およびJIKがいずれもMKK7を直接的にリン酸化することから、これらは異なった経路でMKK7をリン酸化することによりJNK3シグナル伝達経路の活性化に関与していると考えられる。よって、PAK4によるMKK7のリン酸化およびJIKによるMKK7のリン酸化の両方を阻害することにより、どちらか一方によるMKKのリン酸化を阻害するよりも、c-Junのリン酸化の阻害においてより高い効果が得られると考える。

本発明はこのように、JNK3シグナル伝達経路の活性化によって引き起こされる疾患、例えば神経細胞死に基づく疾患、具体的には、神経変性疾患の予防・治療のために、また、神経変性疾患やJNKシグナル伝達機構の研究のために、非常に有用である。

#### 配列表フリーテキスト

配列番号1：PAK4の部分配列（配列番号3）と高い相同意を有する、MKK7の部分配列。

20 配列番号2：PAK4の部分配列（配列番号4）と高い相同意を有する、MKK7の部分配列。

配列番号3：MKK7の部分配列（配列番号1）と高い相同意を有する、PAK4の部分配列。

配列番号4：MKK7の部分配列（配列番号2）と高い相同意を有する、PAK4の部分配列。

配列番号5：JIKの部分配列（配列番号7）と高い相同意を有する、MKK7の部分配列。

配列番号 6 : J I K の部分配列 (配列番号 8) と高い相同意を有する、M K K 7 の部分配列。

配列番号 7 : M K K 7 の部分配列 (配列番号 5) と高い相同意を有する、J I K の部分配列。

5 配列番号 8 : M K K 7 の部分配列 (配列番号 6) と高い相同意を有する、J I K の部分配列。

配列番号 9 : M K K 7 と P A K 4 とのローカルアライメントにおいて高いスコアを示した M K K 7 の部分配列。

配列番号 10 : M K K 7 と P A K 4 とのローカルアライメントにおいて高いスコアを 10 示した P A K 4 の部分配列。

配列番号 11 : M K K 7 、 P A K 4 および J I K の配列において一致する部分配列。

配列番号 12 : M K K 7 と P A K 4 とのローカルアライメントにおいて高いスコアを示した M K K 7 の部分配列。

配列番号 13 : M K K 7 と P A K 4 とのローカルアライメントにおいて高いスコアを 15 示した P A K 4 の部分配列。

配列番号 14 : M K K 7 と P A K 4 とのローカルアライメントにおいて高いスコアを示した M K K 7 の部分配列。

配列番号 15 : M K K 7 と P A K 4 とのローカルアライメントにおいて高いスコアを示した P A K 4 の部分配列。

20 配列番号 16 : M K K 7 と P A K 4 の配列において一致する部分配列。

配列番号 17 : M K K 7 と P A K 4 とのローカルアライメントにおいて高いスコアを示した M K K 7 の部分配列。

配列番号 18 : M K K 7 と P A K 4 とのローカルアライメントにおいて高いスコアを示した P A K 4 の部分配列。

25 配列番号 19 : M K K 7 と P A K 4 とのローカルアライメントにおいて高いスコアを示した M K K 7 の部分配列。

配列番号 20 : M K K 7 と P A K 4 とのローカルアライメントにおいて高いスコアを

示した P A K 4 の部分配列。

配列番号 2 1 : M K K 7 と P A K 4 とのローカルアライメントにおいて高いスコアを示した M K K 7 の部分配列。

配列番号 2 2 : M K K 7 と P A K 4 とのローカルアライメントにおいて高いスコアを

5 示した P A K 4 の部分配列。

配列番号 2 3 : M K K 7 と P A K 4 とのローカルアライメントにおいて高いスコアを示した M K K 7 の部分配列。

配列番号 2 4 : M K K 7 と P A K 4 とのローカルアライメントにおいて高いスコアを示した P A K 4 の部分配列。

10 配列番号 2 5 : M K K 7 と P A K 4 とのローカルアライメントにおいて高いスコアを示した M K K 7 の部分配列。

配列番号 2 6 : M K K 7 と P A K 4 とのローカルアライメントにおいて高いスコアを示した P A K 4 の部分配列。

配列番号 2 7 : M K K 7 と P A K 4 とのローカルアライメントにおいて高いスコアを示した M K K 7 の部分配列。

15 配列番号 2 8 : M K K 7 と P A K 4 とのローカルアライメントにおいて高いスコアを示した P A K 4 の部分配列。

配列番号 2 9 : M K K 7 と J I K とのローカルアライメントにおいて高いスコアを示した M K K 7 の部分配列。

20 配列番号 3 0 : M K K 7 と J I K とのローカルアライメントにおいて高いスコアを示した J I K の部分配列。

配列番号 3 1 : M K K 7 と J I K とのローカルアライメントにおいて高いスコアを示した M K K 7 の部分配列。

配列番号 3 2 : M K K 7 と J I K とのローカルアライメントにおいて高いスコアを示した J I K の部分配列。

25 配列番号 3 3 : M K K 7 と J I K とのローカルアライメントにおいて高いスコアを示した M K K 7 の部分配列。

配列番号 3 4 : MKK 7 と J I K とのローカルアライメントにおいて高いスコアを示した J I K の部分配列。

配列番号 3 5 : MKK 7 と J I K とのローカルアライメントにおいて高いスコアを示した MKK 7 の部分配列。

5 配列番号 3 6 : MKK 7 と J I K とのローカルアライメントにおいて高いスコアを示した J I K の部分配列。

配列番号 3 7 : MKK 7 と J I K とのローカルアライメントにおいて高いスコアを示した MKK 7 の部分配列。

配列番号 3 8 : MKK 7 と J I K とのローカルアライメントにおいて高いスコアを示  
10 10 した J I K の部分配列。

配列番号 3 9 : MKK 7 と J I K とのローカルアライメントにおいて高いスコアを示した MKK 7 の部分配列。

配列番号 4 0 : MKK 7 と J I K とのローカルアライメントにおいて高いスコアを示した J I K の部分配列。

15 配列番号 4 1 : MKK 7 と J I K とのローカルアライメントにおいて高いスコアを示した MKK 7 の部分配列。

配列番号 4 2 : MKK 7 と J I K とのローカルアライメントにおいて高いスコアを示した J I K の部分配列。

配列番号 4 3 : MKK 7 と J I K とのローカルアライメントにおいて高いスコアを示  
20 20 した MKK 7 の部分配列。

配列番号 4 4 : MKK 7 と J I K とのローカルアライメントにおいて高いスコアを示した J I K の部分配列。

配列番号 4 5 : MKK 7 と J I K とのローカルアライメントにおいて高いスコアを示した MKK 7 の部分配列。

25 配列番号 4 6 : MKK 7 と J I K とのローカルアライメントにおいて高いスコアを示した J I K の部分配列。

## 請求の範囲

1. 下記 i) から iv) のうちの少なくとも 1 つを特徴とする、c-Jun N 末端キナーゼ 3 による c-Jun リン酸化の阻害剤；

5 i) p21 活性化キナーゼ 4 (PAK4) と MAP キナーゼキナーゼ 7 (MKK7) の結合阻害、

ii) PAK4 による MKK7 のリン酸化の阻害、

iii) JNK/SAPK-インヒビトリーキナーゼ (JNK/SAPK-inhibitory kinase; JIK) と MAP キナーゼキナーゼ 7 (MKK7) の結合阻害、

10

および

iv) JIK による MKK7 のリン酸化の阻害。

2. 下記 i) から iv) のうちの少なくとも 1 つを特徴とする、c-Jun N 末端キナーゼ 3 による c-Jun リン酸化の阻害方法；

15 i) p21 活性化キナーゼ 4 (PAK4) と MAP キナーゼキナーゼ 7 (MKK7) の結合阻害、

ii) PAK4 による MKK7 のリン酸化の阻害、

iii) JNK/SAPK-インヒビトリーキナーゼ (JNK/SAPK-inhibitory kinase; JIK) と MAP キナーゼキナーゼ 7 (MKK7) の結合阻害、

20

および

iv) JIK による MKK7 のリン酸化の阻害。

3. 下記 i) から iv) のうちの少なくとも 1 つを特徴とする、c-Jun N 末端キナーゼ 3 による c-Jun リン酸化に基づく疾患の防止剤および/または治療剤；

25

i) p21 活性化キナーゼ 4 (PAK4) と MAP キナーゼキナーゼ 7 (MKK7) の結合阻害、

- ii) PAK 4 による MKK 7 のリン酸化の阻害、
- iii) JNK/SAPK-インヒビトリーキナーゼ (JNK/SAPK-inhibitory kinase; JIK) と MAP キナーゼキナーゼ 7 (MKK 7) の結合阻害、

5 および

- iv) JIK による MKK 7 のリン酸化の阻害。

4. 下記 i) から iv) のうちの少なくとも 1 つを特徴とする、神経変性疾患の防止剤および／または治療剤；

- i) p21 活性化キナーゼ 4 (PAK 4) と MAP キナーゼキナーゼ 7 (MKK 7) の結合阻害、
- ii) PAK 4 による MKK 7 のリン酸化の阻害、
- iii) JNK/SAPK-インヒビトリーキナーゼ (JNK/SAPK-inhibitory kinase; JIK) と MAP キナーゼキナーゼ 7 (MKK 7) の結合阻害、

10 15 および

- iv) JIK による MKK 7 のリン酸化の阻害。

5. 下記 i) から iv) のうちの少なくとも 1 つを特徴とする、c-Jun N 末端キナーゼ 3 による c-Jun リン酸化に基づく疾患の防止方法および／または治療方法；

- i) p21 活性化キナーゼ 4 (PAK 4) と MAP キナーゼキナーゼ 7 (MKK 7) の結合阻害、
- ii) PAK 4 による MKK 7 のリン酸化の阻害、
- iii) JNK/SAPK-インヒビトリーキナーゼ (JNK/SAPK-inhibitory kinase; JIK) と MAP キナーゼキナーゼ 7 (MKK 7) の結合阻害、

20 25 および

- iv) JIK による MKK 7 のリン酸化の阻害。

6. 下記 i) から iv) のうちの少なくとも 1 つを特徴とする、神経変性疾患の防止方法および／または治療方法；

i) p 2 1 活性化キナーゼ 4 (PAK4) と MAP キナーゼキナーゼ 7 (MKK7) の結合阻害、

5 ii) PAK4 による MKK7 のリン酸化の阻害、

iii) JNK/SAPK-インヒビトリーキナーゼ (JNK/SAPK-*inhibit*ory kinase; JIK) と MAP キナーゼキナーゼ 7 (MKK7) の結合阻害、

および

10 iv) JIK による MKK7 のリン酸化の阻害。

7. p 2 1 活性化キナーゼ 4 (PAK4) と MAP キナーゼキナーゼ 7 (MKK7) の結合を阻害する化合物の同定方法であって、PAK4 と MKK7 とが結合する条件下で、PAK4 および／または MKK7 を被検化合物と接触させ、次いで、PAK4 と MKK7 との結合により生じるシグナルの存在、不存在または変化を検出することにより、被検化合物が PAK4 と MKK7 との結合を阻害するか否かを決定することを含む同定方法。

8. JNK/SAPK-インヒビトリーキナーゼ (JNK/SAPK-*inhibit*ory kinase; JIK) と MAP キナーゼキナーゼ 7 (MKK7) の結合を阻害する化合物の同定方法であって、JIK と MKK7 とが結合する条件下で、JIK および／または MKK7 を被検化合物と接触させ、次いで、JIK と MKK7 との結合により生じるシグナルの存在、不存在または変化を検出することにより、被検化合物が JIK と MKK7 との結合を阻害するか否かを決定することを含む同定方法。

9. p 2 1 活性化キナーゼ 4 (PAK4) による MAP キナーゼキナーゼ 7 (MKK7) のリン酸化を阻害する化合物の同定方法であって、PAK4 および／または MKK7 と被検化合物を接触させ、MKK7 のリン酸化を検出することのできるシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を導入し、このシグナルおよび

／またはマーカーの存在、不存在または変化を検出することにより、被検化合物がPAK4によるMKK7のリン酸化を阻害するか否かを決定する同定方法。

10. JNK/SAPK-インヒビトリーキナーゼ (JNK/SAPK-inhibitory kinase; JIK) によるMAPキナーゼキナーゼ7 (MKK7) のリン酸化を阻害する化合物の同定方法であって、JIKおよび／またはMKK7と被検化合物を接触させ、MKK7のリン酸化を検出することのできるシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を導入し、このシグナルおよび／またはマーカーの存在、不存在または変化を検出することにより、被検化合物がJIKによるMKK7のリン酸化を阻害するか否かを決定する同定方法。

11. 請求の範囲第7項から第10項のいずれか1項に記載の方法によって得られた化合物。

12. p21活性化キナーゼ4 (PAK4) とMAPキナーゼキナーゼ7 (MKK7) の結合を阻害する化合物。

13. JNK/SAPK-インヒビトリーキナーゼ (JNK/SAPK-inhibitory kinase; JIK) とMAPキナーゼキナーゼ7 (MKK7) の結合を阻害する化合物。

14. p21活性化キナーゼ4 (PAK4) によるMAPキナーゼキナーゼ7 (MKK7) のリン酸化を阻害する化合物。

15. JNK/SAPK-インヒビトリーキナーゼ (JNK/SAPK-inhibitory kinase; JIK) によるMAPキナーゼキナーゼ7 (MKK7) のリン酸化を阻害する化合物。

16. p21活性化キナーゼ4 (PAK4) とMAPキナーゼキナーゼ7 (MKK7) の結合阻害剤。

17. JNK/SAPK-インヒビトリーキナーゼ (JNK/SAPK-inhibitory kinase; JIK) とMAPキナーゼキナーゼ7 (MKK7) の結合阻害剤。

18. p21活性化キナーゼ4 (PAK4) によるMAPキナーゼキナーゼ7 (MKK7) の結合阻害剤。

KK 7) のリン酸化阻害剤。

19. JNK/SAPK-インヒビトリーキナーゼ (JNK/SAPK-inhibitory kinase; JIK) によるMAPキナーゼキナーゼ7 (MKK7) のリン酸化阻害剤。

5 20. 請求の範囲第11項から第15項に記載の化合物および請求の範囲第16項から第19項に記載の阻害剤の少なくとも1種以上を有効量含有してなる医薬組成物。

21. 請求の範囲第11項から第15項に記載の化合物および請求の範囲第16項から第19項に記載の阻害剤の少なくとも1種以上を有効量含有してなる、c-  
10 Jun N末端キナーゼ3によるc-Junリン酸化に基づく疾患の防止剤および／または治療剤。

22. 請求の範囲第11項から第15項に記載の化合物および請求の範囲第16項から第19項に記載の阻害剤の少なくとも1種以上を有効量含有してなる、神經変性疾患の防止剤および／または治療剤。

15 23. 神經変性疾患が、ポリグルタミン病、ハンチントン病、脊髄小脳失調症、球脊髄性筋萎縮症、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症、アルツハイマー病、ダウン症、パーキンソン病、Lewy小体型痴呆症、多系統萎縮症、家族性筋萎縮性側索硬化症、進行性核上性麻痺、皮質基底核変性症、pick病、ファミリアルブリティッシュ デメンチア (familial British dementia), クロイツフェルト-ヤコブ (Creutzfeldt-Jakob) 病、  
20 ゲルストマン-ストラッスラー (Gersmann-Strässler) 症候群、狂牛病 (ウシ海綿状脳症) (BSE)、またはニューロセルピン (neuroserpin) 封入体を伴う家族性痴呆症である請求の範囲第5項若しくは第22項に記載の防止剤および／または治療剤。

25 24. 請求の範囲第11項から第15項に記載の化合物および請求の範囲第16項から第19項に記載の阻害剤の少なくとも1種以上を使用することを特徴とする、c-Jun N末端キナーゼ3によるc-Junリン酸化に基づく疾患の

防止方法および／または治療方法。

25. 請求の範囲第11項から第15項に記載の化合物および請求の範囲第16項から第19項に記載の阻害剤の少なくとも1種以上を使用することを特徴とする、神経変性疾患の防止方法および／または治療方法。

5 26. 神経変性疾患が、ポリグルタミン病、ハンチントン病、脊髄小脳失調症、球脊髄性筋萎縮症、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症、アルツハイマー病、ダウン症、パーキンソン病、Lewy小体型痴呆症、多系統萎縮症、家族性筋萎縮性側索硬化症、進行性核上性麻痺、皮質基底核変性症、pick病、ファミリアルブリティッシュ デメンチア (familial British dementia)、クロイツフェルト-ヤコブ (Creutzfeldt-Jakob) 病、ゲルストマン-ストラッスラー (Gersmann-Strässler) 症候群、狂牛病 (ウシ海綿状脳症) (BSE)、またはニューロセルピン (neuroserpin) 封入体を伴う家族性痴呆症である請求の範囲第6項若しくは第25項に記載の防止方法および／または治療方法。

15 27. p21活性化キナーゼ4 (PAK4)、JNK/SAPK-インヒビトリーキナーゼ (JNK/SAPK-inhibitory kinase; JIK)、PAK4をコードするポリヌクレオチド、JIKをコードするポリヌクレオチド、PAK4をコードするポリヌクレオチドを含有するベクターおよびJIKをコードするポリヌクレオチドを含有するベクターから選ばれる少なくとも1つと、MAPキナーゼキナーゼ7 (MKK7)、MKK7をコードするポリヌクレオチドおよびMKK7をコードするポリヌクレオチドを含有するベクターから選ばれる少なくとも1つとを含んでなる試薬キット。

28. 請求の範囲第7項から第10項のいずれか1項に記載の同定方法に用いる試薬キットであって、p21活性化キナーゼ4 (PAK4)、JNK/SAPK-インヒビトリーキナーゼ (JNK/SAPK-inhibitory kinase; JIK)、PAK4をコードするポリヌクレオチド、JIKをコードするポリヌクレオチド、PAK4をコードするポリヌクレオチドを含有するベクタ

ーおよびJIKをコードするポリヌクレオチドを含有するベクターから選ばれる少なくとも1つと、MAPキナーゼキナーゼ7 (MKK7)、MKK7をコードするポリヌクレオチドおよびMKK7をコードするポリヌクレオチドを含有するベクターから選ばれる少なくとも1つとを含んでなる試薬キット。

## 第1図

Score = 57.7

299 YDIRADVWSLGISLVELATGQF PY  
 492 YGPEVDIWSLGIMVIEVDGEPPY  
 Y D WSLGI E G PY  
 (配列番号11)

Score = 45.3

120 LENLGEMGSGTCGQVWKMRFRKTGHVIAVKQM  
 321 LDNFIKIGEGSTGIVCIATVRSSGKLVAVKKM  
 L N G G G V R G AVK M  
 (配列番号12)  
 (配列番号13)

Score = 37.0

65 PTTPPARPRHMLGLP  
 105 PPPPARARQENGMP  
 P PPAR R G P  
 (配列番号14)  
 (配列番号15)  
 (配列番号16)

Score = 31.4

361 LTKDHRKRKPYNKLLEHSFIKR  
 553 LVRDPAQRATAEELLKHPFLAK  
 L D R LL H F  
 (配列番号17)  
 (配列番号18)

Score = 30.9

169 VLKSHDCPYIVQCFGTFITNTDVFIAMELM  
 368 VIMRDYQHENVEMYNSYLVGDELWVVMF  
 V V ME  
 (配列番号19)  
 (配列番号20)

Score = 27.0

33 DISPQRPRPT-LQLPLANDGGSRSPSSESSPQHP  
 226 DVAPNGPSAGGLAIPQSSSSSRPPTRARGAPSP  
 D P P L P SR P P  
 (配列番号21)  
 (配列番号22)

Score = 27.9

58 SESSPQHPTPPARPR  
 240 PQSSSSSRPPTRAR  
 SS PP R R  
 (配列番号23)  
 (配列番号24)

Score = 26.9

51 GGSRSPSSESSPQHPTPPAR  
 235 GGLAIPQSSSSSRPPTRAR  
 GG P S SS P AR  
 (配列番号25)  
 (配列番号26)

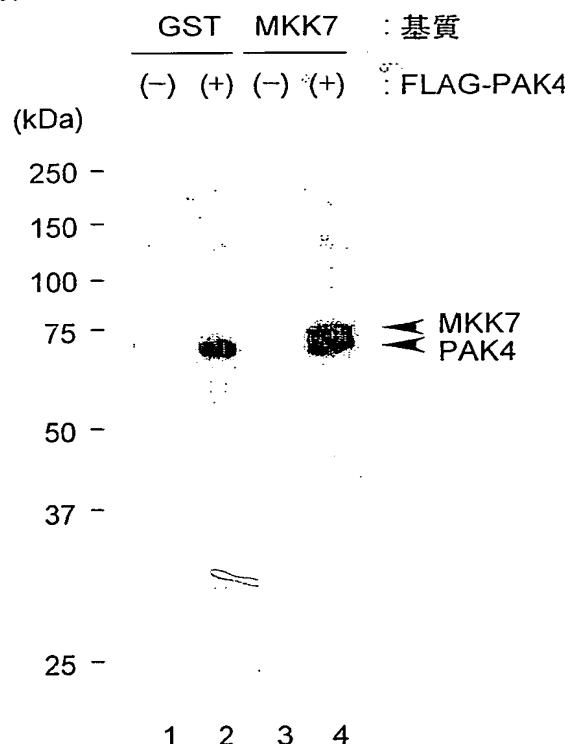
Score = 25.1

34 ISPQRPRPTLQLPLANDGGSR  
 299 VSHEQFRAALQL-VVDPGDPRS  
 S R LQL G RS  
 (配列番号27)  
 (配列番号28)

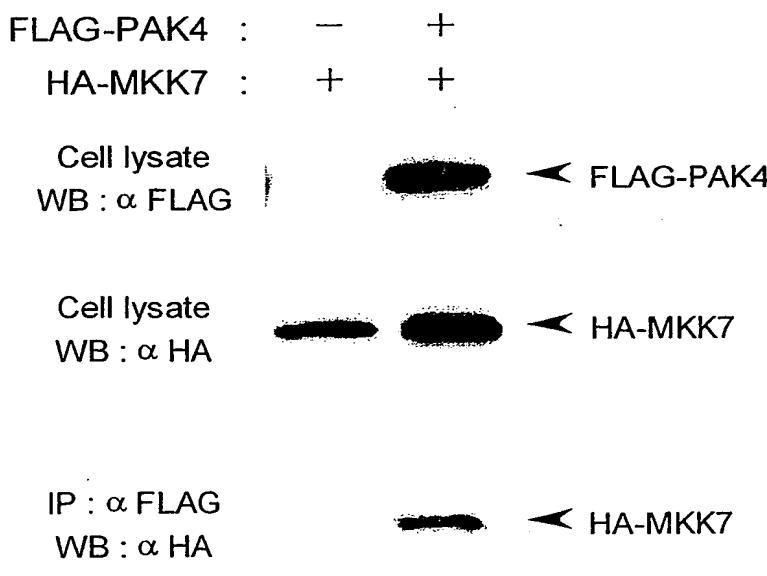
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

2/6

第2図



第3図

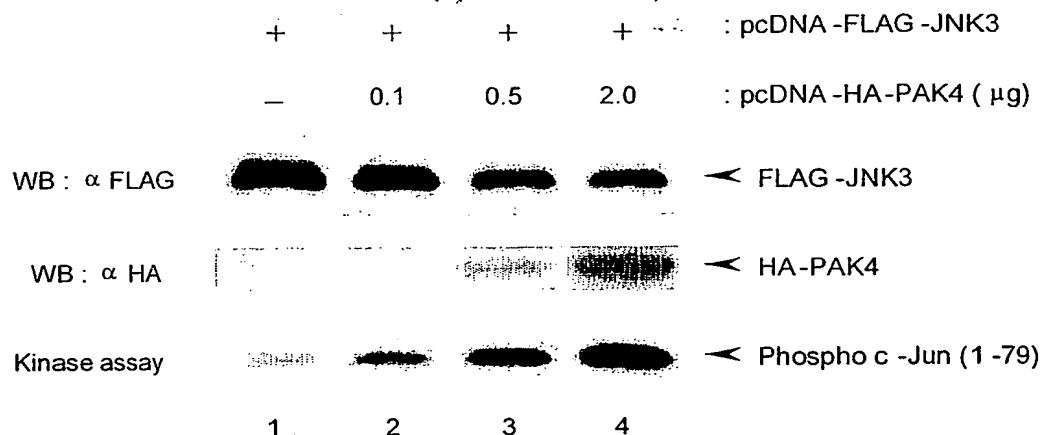


BEST AVAILABLE COPY

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

3/6

第4図



BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)

## 第5図

Score = 59.6

299 YDIRADWWSLGISLVELA  
 198 YDGKVDIWSLGITCIELA  
 YD D WSLGI ELA  
 (配列番号11)

(配列番号29)  
 (配列番号30)

Score = 39.0

123 LGEMGSGTCGQVWKMRFRKTGHVIAVKQMRRSGNK (配列番号31)  
 27 LHEIGHGSFGAVYFATNAHTSEVVAIKKMSYSKGQ (配列番号32)  
 L E G G G V T V A K M S G

Score = 30.1

7 EQKLSRLEAKLKQENREARRRI  
 472 QKQLIALENKLKAEMDEHRLKL  
 L LE KLK E E R

(配列番号33)  
 (配列番号34)

Score = 28.9

91 EIDQKQLQEIMKQTGYL  
 61 QTTHEKWQDILKEVKFL  
 K Q I K L

(配列番号35)  
 (配列番号36)

Score = 29.3

102 QTGYLTIGGQRYQAEINDL  
 761 QTRKLAILAEQYEQSINEM  
 QT L I Y IN

(配列番号37)  
 (配列番号38)

Score = 25.7

6 LEQKLSRLEAKLKQENRE  
 831 LEQRVSLRRAHLEQKIEE  
 LEQ S A L Q E

(配列番号39)  
 (配列番号40)

Score = 26.4

111 QRYQAEINDLENL  
 291 QRTKDAVRELDNL  
 QR L NL

(配列番号41)  
 (配列番号42)

Score = 26.3

201 TCAEKLKKRM  
 558 ICKEKIKEEM  
 C E K K M

(配列番号43)  
 (配列番号44)

Score = 26.7

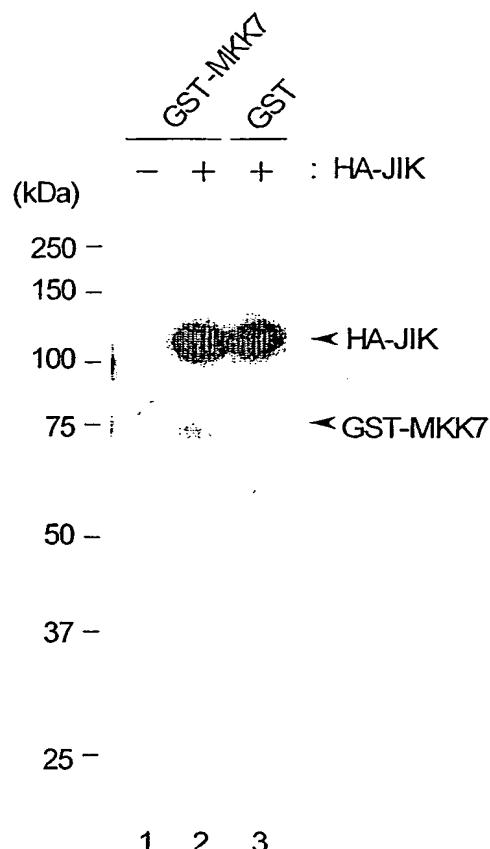
236 KHGVIRDVKPSNILL  
 273 RHDFVRRD-RPLRVLID  
 H RD P L D

(配列番号45)  
 (配列番号46)

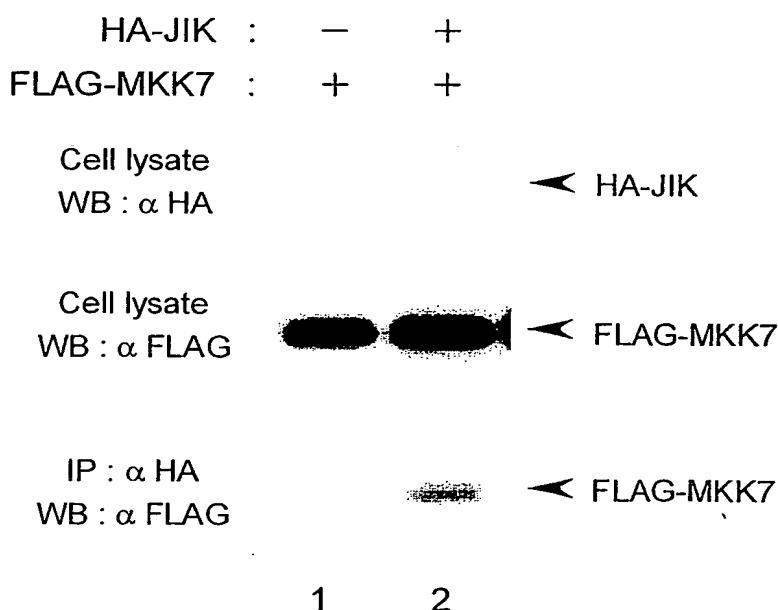
THIS PAGE BLANK (USP10)

5/6

第6図



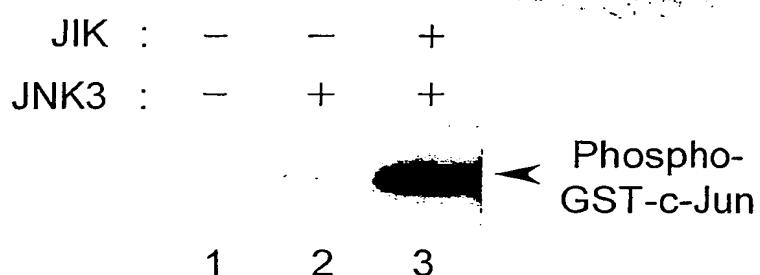
第7図



THIS PAGE BLANK (USPTO)

6/6

第8図



BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)

## SEQUENCE LISTING

<110> DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.  
CELESTAR LEXICO-SCIENCES, INC.

<120> An inhibitor for MKK7 activation

<130> GP03-1018PCT

<150> JP P 2002-190909

<151> 2002-06-28

<150> JP P 2002-190910

<151> 2002-06-28

<160> 46

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> Partial sequence of MKK7, which is highly homologous to that (SEQ ID NO:3) of PAK4

<400> 1

Asp Val Trp Ser Leu Gly Ile  
1 5

<210> 2

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> Partial sequence of MKK7, which is highly homologous to that (SEQ ID NO:4) of PAK4

<400> 2

Pro Pro Ala Arg Pro Arg  
1 5

<210> 3  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> Partial sequence of PAK4, which is highly homologous to that (SEQ ID NO:1) of MKK7

<400> 3

Asp Ile Trp Ser Leu Gly Ile  
1 5

<210> 4  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> Partial sequence of PAK4, which is highly homologous to that (SEQ ID NO:2) of MKK7

<400> 4

Pro Pro Ala Arg Ala Arg  
1 5

<210> 5  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Partial sequence of MKK7, which is highly homologous to that (SEQ ID NO:7) of JIK

<400> 5

Trp Ser Leu Gly Ile Ser  
1 5

<210> 6  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Partial sequence of MKK7, which is highly homologous to that (SEQ ID NO:8) of JIK

<400> 6

Leu Glu Ala Lys Leu Lys  
1 5

<210> 7  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Partial sequence of JIK, which is highly homologous to that (SEQ ID NO:5) of MKK7

<400> 7

Trp Ser Leu Gly Ile Thr  
1 5

<210> 8  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Partial sequence of JIK, which is highly homologous to that (SEQ ID NO:6) of MKK7

<400> 8

Leu Glu Asn Lys Leu Lys  
1 5

<210> 9

4/18

<211> 24  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> Partial sequence of MKK7, showing high score in the local alignment between MKK7 and PAK4

<400> 9

Tyr Asp Ile Arg Ala Asp Val Trp Ser Leu Gly Ile Ser Leu Val Glu  
1 5 10 15

Leu Ala Thr Gly Gln Phe Pro Tyr  
20

<210> 10  
<211> 24  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Partial sequence of PAK4, showing high score in the local alignment between MKK7 and PAK4

<400> 10

Tyr Gly Pro Glu Val Asp Ile Trp Ser Leu Gly Ile Met Val Ile Glu  
1 5 10 15

Met Val Asp Gly Glu Pro Pro Tyr  
20

<210> 11  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Partial sequence identical in the sequences of MKK7, PAK4 and JIK

<400> 11

Trp Ser Leu Gly Ile  
1 5

<210> 12  
<211> 32  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> Partial sequence of MKK7, showing high score in the local alignment between MKK7 and PAK4

<400> 12

Leu Glu Asn Leu Gly Glu Met Gly Ser Gly Thr Cys Gly Gln Val Trp  
1 5 10 15

Lys Met Arg Phe Arg Lys Thr Gly His Val Ile Ala Val Lys Gln Met  
20 25 30

<210> 13  
<211> 32  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Partial sequence of PAK4, showing high score in the local alignment between MKK7 and PAK4

<400> 13

Leu Asp Asn Phe Ile Lys Ile Gly Glu Gly Ser Thr Gly Ile Val Cys  
1 5 10 15

Ile Ala Thr Val Arg Ser Ser Gly Lys Leu Val Ala Val Lys Lys Met  
20 25 30

<210> 14  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

6/18

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;223&gt; Partial sequence of MKK7, showing high score in the local alignment between MKK7 and PAK4

&lt;400&gt; 14

Pro	Thr	Pro	Pro	Ala	Arg	Pro	Arg	His	Met	Leu	Gly	Leu	Pro
1					5					10			

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;223&gt; Partial sequence of PAK4, showing high score in the local alignment between MKK7 and PAK4

&lt;400&gt; 15

Pro	Pro	Pro	Pro	Ala	Arg	Ala	Arg	Gln	Glu	Asn	Gly	Met	Pro
1					5				10				

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 4

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;223&gt; Partial sequence identical in the sequences of MKK7 and PAK4

&lt;400&gt; 16

Pro	Pro	Ala	Arg
1			

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

7/18

<223> Partial sequence of MKK7, showing high score in the local alignment between MKK7 and PAK4

<400> 17

Leu Thr Lys Asp His Arg Lys Arg Pro Lys Tyr Asn Lys Leu Leu Glu  
1 5 10 15

His Ser Phe Ile Lys Arg  
20

<210> 18

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc\_feature

<223> Partial sequence of PAK4, showing high score in the local alignment between MKK7 and PAK4

<400> 18

Leu Val Arg Asp Pro Ala Gln Arg Ala Thr Ala Ala Glu Leu Leu Lys  
1 5 10 15

His Pro Phe Leu Ala Lys  
20

<210> 19

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc\_feature

<223> Partial sequence of MKK7, showing high score in the local alignment between MKK7 and PAK4

<400> 19

Val Val Leu Lys Ser His Asp Cys Pro Tyr Ile Val Gln Cys Phe Gly  
1 5 10 15

8/18

Thr Phe Ile Thr Asn Thr Asp Val Phe Ile Ala Met Glu Leu Met  
20 25 30

<210> 20  
<211> 31  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Partial sequence of PAK4, showing high score in the local alignment between MKK7 and PAK4

<400> 20

Val Ile Met Arg Asp Tyr Gln His Glu Asn Val Val Glu Met Tyr Asn  
1 5 10 15

Ser Tyr Leu Val Gly Asp Glu Leu Trp Val Val Met Glu Phe Leu  
20 25 30

<210> 21  
<211> 33  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Partial sequence of MKK7, showing high score in the local alignment between MKK7 and PAK4

<400> 21

Asp Ile Ser Pro Gln Arg Pro Arg Pro Thr Leu Gln Leu Pro Leu Ala  
1 5 10 15

Asn Asp Gly Gly Ser Arg Ser Pro Ser Ser Glu Ser Ser Pro Gln His  
20 25 30

Pro

<210> 22  
<211> 34

9/18

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;223&gt; Partial sequence of PAK4, showing high score in the local alignment between MKK7 and PAK4

&lt;400&gt; 22

Asp	Val	Ala	Pro	Asn	Gly	Pro	Ser	Ala	Gly	Gly	Leu	Ala	Ile	Pro	Gln
1					5				10					15	

Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Arg	Pro	Pro	Thr	Arg	Ala	Arg	Gly	Ala	Pro
						20		25			30				

Ser Pro

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;223&gt; Partial sequence of MKK7, showing high score in the local alignment between MKK7 and PAK4

&lt;400&gt; 23

Ser	Glu	Ser	Ser	Pro	Gln	His	Pro	Thr	Pro	Pro	Ala	Arg	Pro	Arg
1					5				10			15		

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;223&gt; Partial sequence of PAK4, showing high score in the local alignment between MKK7 and PAK4

&lt;400&gt; 24

10/18

Pro Gln Ser Ser Ser Ser Ser Arg Pro Pro Thr Arg Ala Arg  
1 5 10 15

<210> 25

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc\_feature

<223> Partial sequence of MKK7, showing high score in the local alignment between MKK7 and PAK4

<400> 25

Gly Gly Ser Arg Ser Pro Ser Ser Glu Ser Ser Pro Gln His Pro Thr  
1 5 10 15

Pro Pro Ala Arg  
20

<210> 26

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc\_feature

<223> Partial sequence of PAK4, showing high score in the local alignment between MKK7 and PAK4

<400> 26

Gly Gly Leu Ala Ile Pro Gln Ser Ser Ser Ser Ser Arg Pro Pro  
1 5 10 15

Thr Arg Ala Arg  
20

<210> 27

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

11/18

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;223&gt; Partial sequence of MKK7, showing high score in the local alignment between MKK7 and PAK4

&lt;400&gt; 27

Ile	Ser	Pro	Gln	Arg	Pro	Arg	Pro	Thr	Leu	Gln	Leu	Pro	Leu	Ala	Asn
1				5					10					15	

Asp	Gly	Gly	Ser	Arg	Ser
20					

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;223&gt; Partial sequence of PAK4, showing high score in the local alignment between MKK7 and PAK4

&lt;400&gt; 28

Val	Ser	His	Glu	Gln	Phe	Arg	Ala	Ala	Leu	Gln	Leu	Val	Val	Asp	Pro
1				5					10				15		

Gly	Asp	Pro	Arg	Ser
20				

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;223&gt; Partial sequence of MKK7, showing high score in the local alignment between MKK7 and JIK

&lt;400&gt; 29

Tyr	Asp	Ile	Arg	Ala	Asp	Val	Trp	Ser	Leu	Gly	Ile	Ser	Leu	Val	Glu
1					5				10				15		

12/18

Leu Ala

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;223&gt; Partial sequence of JIK, showing high score in the local alignment between MKK7 and JIK

&lt;400&gt; 30

Tyr	Asp	Gly	Lys	Val	Asp	Ile	Trp	Ser	Leu	Gly	Ile	Thr	Cys	Ile	Glu
1				5					10					15	

Leu Ala

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;223&gt; Partial sequence of MKK7, showing high score in the local alignment between MKK7 and JIK

&lt;400&gt; 31

Leu	Gly	Glu	Met	Gly	Ser	Gly	Thr	Cys	Gly	Gln	Val	Trp	Lys	Met	Arg
1				5					10				15		

Phe	Arg	Lys	Thr	Gly	His	Val	Ile	Ala	Val	Lys	Gln	Met	Arg	Arg	Ser
				20					25				30		

Gly Asn Lys  
35

13/18

<210> 32  
<211> 35  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Partial sequence of JIK, showing high score in the local alignment between MKK7 and JIK

<400> 32

Leu His Glu Ile Gly His Gly Ser Phe Gly Ala Val Tyr Phe Ala Thr  
1 5 10 15

Asn Ala His Thr Ser Glu Val Val Ala Ile Lys Lys Met Ser Tyr Ser  
20 25 30

Gly Lys Gln  
35

<210> 33  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Partial sequence of MKK7, showing high score in the local alignment between MKK7 and JIK

<400> 33

Glu Gln Lys Leu Ser Arg Leu Glu Ala Lys Leu Lys Gln Glu Asn Arg  
1 5 10 15

Glu Ala Arg Arg Arg Ile  
20

<210> 34  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>

14/18

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;223&gt; Partial sequence of JIK, showing high score in the local alignment between MKK7 and JIK

&lt;400&gt; 34

Gln	Lys	Gln	Leu	Ile	Ala	Leu	Glu	Asn	Lys	Leu	Lys	Ala	Glu	Met	Asp
1				5					10					15	

Glu	His	Arg	Leu	Lys	Leu
20					

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;223&gt; Partial sequence of MKK7, showing high score in the local alignment between MKK7 and JIK

&lt;400&gt; 35

Glu	Ile	Asp	Gln	Lys	Leu	Gln	Glu	Ile	Met	Lys	Gln	Thr	Gly	Tyr	Leu
1				5				10					15		

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;223&gt; Partial sequence of JIK, showing high score in the local alignment between MKK7 and JIK

&lt;400&gt; 36

Gln	Thr	His	Glu	Lys	Trp	Gln	Asp	Ile	Leu	Lys	Glu	Val	Lys	Phe	Leu
1				5					10				15		

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; PRT

15/18

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc\_feature

<223> Partial sequence of MKK7, showing high score in the local alignment between MKK7 and JIK

<400> 37

Gln Thr Gly Tyr Leu Thr Ile Gly Gly Gln Arg Tyr Gln Ala Glu Ile  
1 5 10 15

Asn Asp Leu

<210> 38

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc\_feature

<223> Partial sequence of JIK, showing high score in the local alignment between MKK7 and JIK

<400> 38

Gln Thr Arg Lys Leu Ala Ile Leu Ala Glu Gln Tyr Glu Gln Ser Ile  
1 5 10 15

Asn Glu Met

<210> 39

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc\_feature

<223> Partial sequence of MKK7, showing high score in the local alignment between MKK7 and JIK

<400> 39

16/18

Leu Glu Gln Lys Leu Ser Arg Leu Glu Ala Lys Leu Lys Gln Glu Asn  
1 5 10 15

Arg Glu

<210> 40  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Partial sequence of JIK, showing high score in the local alignment between MKK7 and JIK

<400> 40

Leu Glu Gln Arg Val Ser Leu Arg Arg Ala His Leu Glu Gln Lys Ile  
1 5 10 15

Glu Glu

<210> 41  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Partial sequence of MKK7, showing high score in the local alignment between MKK7 and JIK

<400> 41

Gln Arg Tyr Gln Ala Glu Ile Asn Asp Leu Glu Asn Leu  
1 5 10

<210> 42  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<220>

17/18

<221> misc\_feature  
<223> Partial sequence of JIK, showing high score in the local alignment between MKK7 and JIK

<400> 42

Gln Arg Thr Lys Asp Ala Val Arg Glu Leu Asp Asn Leu  
1 5 10

<210> 43  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Partial sequence of MKK7, showing high score in the local alignment between MKK7 and JIK

<400> 43

Thr Cys Ala Glu Lys Leu Lys Lys Arg Met  
1 5 10

<210> 44  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Partial sequence of JIK, showing high score in the local alignment between MKK7 and JIK

<400> 44

Ile Cys Lys Glu Lys Ile Lys Glu Glu Met  
1 5 10

<210> 45  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> misc\_feature

18/18

<223> Partial sequence of MKK7, showing high score in the local alignme nt between MKK7 and JIK

<400> 45

Lys His Gly Val Ile His Arg Asp Val Lys Pro Ser Asn Ile Leu Leu  
1 5 10 15

Asp

<210> 46

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc\_feature

<223> Partial sequence of JIK, showing high score in the local alignmen t between MKK7 and JIK

<400> 46

Arg His Asp Phe Val Arg Arg Asp Arg Pro Leu Arg Val Leu Ile Asp  
1 5 10 15

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/08179

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K45/00, A61P25/00, 25/14, 25/16, 25/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K45/00, A61P25/00, 25/14, 25/16, 25/28

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN),  
SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 99/01559 A1 (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.), 14 January, 1999 (14.01.99), & AU 9879373 A1 & EP 1008650 A1 & US 6465618 B1	1, 3-4, 7-23, 27-28
A	Xiaoling Xie et al., Crystal Structure of JNK3: a kinase implicated in neuronal apoptosis, Structure, 1998, Vol.6, pages 983 to 991	1, 3-4, 7-23, 27-28
A	Atsushi IKEDA et al., Mixed Lineage Kinase LZK Forms a Functional Signaling Complex with JIP-1, a Scaffold Protein of the c-Jun NH <sub>2</sub> -Terminal Kinase Pathway, J.Biochem., Vol.130, 2001, pages 773 to 781	1, 3-4, 7-23, 27-28

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

- \* Special categories of cited documents:  
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
09 September, 2003 (09.09.03)Date of mailing of the international search report  
24 September, 2003 (24.09.03)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. .

PCT/JP03/08179

## C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Junji YAMAUCHI et al., Differential Regulation of Mitogenactivated Protein Kinase Kinase 4 (MKK4) and 7 (MKK7) by Signaling from G Protein $\beta$ $\gamma$ Subunit in Human Embryonal Kidney 293 Cells, <i>The Journal of Biological Chemistry</i> , Vol.274, No.4, 1999, pages 1957 to 1966	1, 3-4, 7-23, 27-28
A	Zhengbin Yao et al., Activation of Stress-activated Protein Kinases/c-Jun N-terminal Protein Kinases (SAPKs/JNKs) by a Novel Mitogen-activated Protein Kinase Kinase (MKK7), <i>The Journal of Biological Chemistry</i> , Vol.272, No.51, 1997, pages 32378 to 32383	1, 3-4, 7-23, 27-28
A	Cathy Tournier et al., The MKK7 Gene Encodes a Group of c-Jun NH <sub>2</sub> -Terminal Kinase Kinases, <i>Molecular and Cellular Biology</i> , Vol.19, No.2, 1999, pages 1569 to 1581	1, 3-4, 7-23, 27-28
A	Yi-Rong Chen et al., Mammalian c-Jun N-terminal kinase pathway and STE20-related kinases, <i>Gene Ther. Mol. Biol.</i> , Vol.4, 1999, pages 83 to 98	1, 3-4, 7-23, 27-28
A	Ippei Dan et al., The Ste20 group kinases as regulators of MAP kinase cascades, <i>TRENDS in Cell Biology</i> , Vol.11, No.5, 2001, pages 220 to 230	1, 3-4, 7-23, 27-28

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/08179

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 2, 5-6, 24, 26

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 2, 5 to 6 and 24 to 26 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2) (a) (i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2.  Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3.  Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Concerning c-Jun phosphorylation, claim 1 involves 4 inventions respectively having the following "special technical features", i.e., "inhibition of binding of PAK4 to MKK7", "inhibition of phosphorylation of MKK7 by PAK4", "inhibition of binding of JIK to MKK7" and "inhibition of phosphorylation of MKK7 by JIK". Since there is no technical relevancy involving one or more of the same or corresponding technical features among these inventions, they are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

### Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP03/08179

Claims 1, 3 to 4, 7 to 23 and 27 to 28 relate to c-Jun phosphorylation inhibitors each containing as the active ingredient a compound defined by a desired property, i.e., "inhibition of binding of PAK4 to MKK7", "inhibition of phosphorylation of MKK7 by PAK4", "inhibition of binding of JIK to MKK7" or "inhibition of phosphorylation of MKK7 by JIK". Although claims 1, 3 to 4, 7 to 23 and 27 to 28 involve any compounds having these properties, it is recognized that only parts of the claimed compounds are supported by the description in the meaning as described in PCT Article 6 and disclosed therein in the meaning as described in PCT Article 5.

Although the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, the scope of the compound having "an activity of inhibiting binding of PAK4 to MKK7", "an activity of inhibiting phosphorylation of MKK7 by PAK4", "an activity of inhibiting binding of JIK to MKK7" or "an activity of inhibiting phosphorylation of MKK7 by JIK" cannot be specified. Thus, claims 1, 3 to 4, 7 to 23 and 27 to 28 also fail to fulfill the requirement of clearness as described in PCT Article 6.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C17 A61K 45/00, A61P 25/00, 25/14, 25/16, 25/28

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C17 A61K 45/00, A61P 25/00, 25/14, 25/16, 25/28

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN), SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 99/01559 A1 (旭化成工業株式会社) 1999. 01. 14 &AU 9879373 A1 &EP 1008650 A1 &US 6465618 B1	1, 3-4, 7-23, 27-28
A	Xiaoling Xie et al., Crystal Structure of JNK3: a kinase implicated in neuronal apoptosis, Structure, 1998, Vol. 6, p. 983-991	1, 3-4, 7-23, 27-28

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09. 09. 03

国際調査報告の発送日

24.09.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)  
郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

八原 由美子

4 C 9261



電話番号 03-3581-1101 内線 3451

C (続き) . 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
A	Atsushi Ikeda et al., Mixed Lineage Kinase LZK Forms a Functional Signaling Complex with JIP-1, a Scaffold Protein of the c-Jun NH <sub>2</sub> -Terminal Kinase Pathway, <i>J. Biochem.</i> , Vol. 130, 2001, p. 773-781	1, 3-4, 7-23, 27-28
A	Junji Yamauchi et al., Differential Regulation of Mitogen-activated Protein Kinase Kinase 4(MKK4) and 7(MKK7) by Signaling from G Protein $\beta$ $\gamma$ Subunit in Human Embryonal Kidney 293 Cells, <i>The Journal of Biological Chemistry</i> , Vol. 274, No. 4, 1999, p. 1957-1966	1, 3-4, 7-23, 27-28
A	Zhengbin Yao et al., Activation of Stress-activated Protein Kinases/c-Jun N-terminal Protein Kinases(SAPKs/JNKS) by a Novel Mitogen-activated Protein Kinase Kinase(MKK7), <i>The Journal of Biological Chemistry</i> , Vol. 272, No. 51, 1997, p. 32378-32383	1, 3-4, 7-23, 27-28
A	Cathy Tournier et al., The MKK7 Gene Encodes a Group of c-Jun NH <sub>2</sub> -Terminal Kinase Kinases, <i>Molecular and Cellular Biology</i> , Vol. 19, No. 2, 1999, p. 1569-1581	1, 3-4, 7-23, 27-28
A	Yi-Rong Chen et al., Mammalian c-Jun N-terminal kinase pathway and STE20-related kinases, <i>Gene Ther. Mol. Biol.</i> , Vol. 4, 1999, p. 83-98	1, 3-4, 7-23, 27-28
A	Ippeita Dan et al., The Ste20 group kinases as regulators of MAP kinase cascades, <i>TRENDS in Cell Biology</i> , Vol. 11, No. 5, 2001, p. 220-230	1, 3-4, 7-23, 27-28

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲 2, 5-6, 24-26 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、  
請求の範囲 2, 5-6, 24-26 は、治療による人体の処置方法に関するものであつて、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をできる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1には、c-Junリン酸化の阻害剤に関し、「PAK4とMMK7の結合阻害」、「PAK4によるMMK7のリン酸化の阻害」、「JIKとMMK7の結合阻害」、あるいは「JIKによるMMK7のリン酸化の阻害」という「特別な技術的特徴」を有する4つの発明を包含し、これらの発明は、一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的な関係にないから、单一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められない。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

請求の範囲1, 3-4, 7-23, 27-28は、「PAK4とMMK7の結合阻害」、「PAK4によるMMK7のリン酸化の阻害」、「JIKとMMK7の結合阻害」、あるいは「JIKによるMMK7のリン酸化の阻害」という所望の性質により定義された化合物を有効成分とするc-Junリン酸化の阻害剤に関するものである。そして、請求の範囲1, 3-4, 7-23, 27-28は、そのような性質を有するあらゆる化合物を包含するものであるが、PCT6条の意味において明細書に裏付けられ、また、PCT5条の意味において開示されているのは、クレームされた化合物のごくわずかな部分にすぎないものと認められる。

また、「PAK4とMMK7の結合阻害活性」、「PAK4によるMMK7のリン酸化の阻害活性」、「JIKとMMK7の結合阻害活性」、あるいは「JIKによるMMK7のリン酸化の阻害活性」を有する化合物は、出願時の技術常識を勘案してもそのような性質を有する化合物の範囲を特定できないから、請求の範囲1, 3-4, 7-23, 27-28は、PCT6条における明確性の要件も欠いている。